



ประสิทธิภาพวัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส ในหนูทดลอง



ณัฐชัย สายวาริน

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ประสิทธิภาพวัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส ในหนูทดลอง



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ประสิทธิภาพวัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส ในหนูทดลอง"

ของ ญัฐชัย สายวาริน

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพบุลย์ จิตประเสริฐวงศ์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.จันทร์ทิภา จบศรี)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สดี ไวโรจนศักดิ์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล)

อนุมัติ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ประสิทธิภาพวัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในหนูทดลอง
ผู้วิจัย	ณัฐชัย สายวาริน
ประธานที่ปรึกษา	ดร. จันทร์ทิภา จบศรี
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สดี ไวโรจนศักดิ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาทันตแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563
คำสำคัญ	วัคซีนดีเอ็นเอ โปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของมันฝรั่ง พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โรคปริทันต์อักเสบ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีนดีเอ็นเอ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เกิดสมดุลไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ในงานวิจัยนี้ต้องการทดสอบความสามารถของวัคซีน FimA-PVXCP ต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ผลิตแอนติบอดีจำเพาะ และผลการป้องกันการละลายตัวของกระดูก

วิธีการดำเนินการวิจัย การศึกษาใช้วัคซีน 3 ชนิดได้แก่ วัคซีนต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส หรือวัคซีน FimA-PVXCP วัคซีน FimA และวัคซีนควบคุมลบ BCL ทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง 2 เทคนิคคือฉีดเข้ากล้ามเนื้อและการหยดวัคซีนทางจมูก เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีนแต่ได้รับเชื้อ (P.g. challenge control) และกลุ่มควบคุมลบ กระตุ้นภูมิคุ้มกันจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเก็บเลือดและน้ำลายมาทดสอบการสร้างแอนติบอดี จากนั้นทำหนูติดเชื้อโดยการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ทำการเก็บน้ำลายก่อนการุณยฆาตเก็บซีรัมครั้งสุดท้ายขณะการุณยฆาต จากนั้นตัดหัวแบ่งครึ่งขากรรไกรบน (Hemi maxilla) นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระดูกด้วยเครื่อง Micro-CT

ผลการวิจัย ผลการวิเคราะห์หาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฟิมเบรีย เอ ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP, FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) โดยพบค่าไตเตอร์ของ IgG ในซีรัม 19,973 และ 37,742.22 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูกมีการสร้างแอนติบอดีที่ต่ำ หรือแทบไม่มีการสร้างเลย เมื่อพิจารณาผลการสร้าง IgG ในซีรัมสุดท้ายขณะการุณยฆาต พบว่า

กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีปริมาณไตเตอร์มาตรฐานของ IgG ในซีรัม 35,326 ยูนิต/มิลลิลิตร และกลุ่ม *P.g. challenge control* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมากกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่มีปริมาณไตเตอร์มาตรฐานของแอนติบอดี IgG ในซีรัม ประมาณ 19,893 ยูนิต/มิลลิลิตร อีกทั้งพบว่าในทุกวัคซีน ทุกเทคนิคของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA)

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดุกเข้าฟัน พบว่าร้อยละของปริมาตรกระดุกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 65.01 ± 0.53 มากกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 62.25 ± 0.49 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความหนาแน่นของกระดุก กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่า 3.46 ± 0.13 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตรมากกว่า วัคซีน FimA ที่มีความหนาแน่นของกระดุก 3.34 ± 0.13 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนพารามิเตอร์ระยะเปลี่ยนแปลงของกระดุกโดยวัดจากรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน กับ ยอดของกระดุกเข้าฟัน ในกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP, FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าเฉลี่ยของระยะการละลายตัวของกระดุก 0.176 ± 0.001 และ 0.177 ± 0.001 มิลลิเมตร ซึ่งใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ทั้ง 2 กลุ่มวัคซีน มีค่าเฉลี่ยของระยะการละลายตัวของกระดุกที่น้อยกว่าแตกต่างกับกลุ่ม *P.g. challenge control* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในพารามิเตอร์สุดท้าย ร้อยละการละลายตัวของกระดุกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าการละลายตัวของกระดุกน้อยกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยเป็นร้อยละ 23.6 ± 1.83 และ 26.88 ± 1.36 ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย วัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส (FimA-PVXCP vaccine) ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มีการสร้างแอนติบอดี IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิสในซีรัม ได้เทียบเท่ากับวัคซีน FimA และพบว่าสามารถยกระดับ IgG ได้เมื่อเวลาผ่านไป ผลของการป้องกันการละลายตัวของกระดุกในกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ สามารถป้องกันการละลายตัวของกระดุกเข้าฟันได้ดีกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ

Title	EFFICIENCY OF <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> DNA VACCINE IN A MOUSE MODEL
Author	NATTACHAI SAIWARIN
Advisor	Jantipa Jobsri, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Sodsi Wirojchanasak, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Master of Sciences in Dentistry (Periodontics) - Type A 2, Naresuan University, 2020
Keywords	DNA vaccine Potato virus X coat protein Porphyromonas gingivalis Periodontitis

ABSTRACT

Objective: Immunization with DNA vaccine is an alternative approach which promotes immune response to balance host-pathogen homeostasis for periodontitis prevention. Efficiency of FimA-PVXCP vaccine was evaluated in perspective of specific antibody production and alveolar bone loss prevention against *Porphyromonas gingivalis* (P.g.).

Method: This study used 3 vaccines; (FimA-PVXCP vaccine, FimA vaccine and Negative control BCL vaccine) to immunize mice by intramuscular and intranasal techniques. P.g. challenge control group and negative control group were included. Vaccine groups were immunized 2 times then all groups were collected serum and saliva to detect antibody production. *P. gingivalis* inoculation by oral gavage. Saliva samples were collected before euthanasia and final sera were collected during euthanasia. The hemi-maxilla samples were scanned for bone analysis by Micro-CT.

Result: FimA-PVXCP vaccine and FimA vaccine administered by intramuscular technique (IM) induced specific IgG at titer level 19,973 and 37,742.22 unit/ml, respectively, while intranasal administration with similar vaccines did not show antibody response. Final serum antibody analysis by ELISA demonstrated that FimA-PVXCP immunized by intramuscular technique had the highest specific serum

IgG titer (35,326 unit/ml) in comparison to *P.g.* challenge control group ($p<0.05$) while FimA vaccination induced specific serum IgG at titer 19,893 unit/ml. Specific saliva IgA production was not detected in all vaccination groups immunized by any techniques.

For bone analysis, percent bone volume/total volume of FimA-PVXCP (IM) group was $65.01\pm0.53\%$ which was higher than FimA vaccine (IM) group at level $62.25\pm0.49\%$ ($p<0.01$). Bone mineralized density of FimA-PVXCP (IM) group was $3.46\pm0.13\text{ g/cm}^3$ which was higher than FimA(IM) group that had bone density at $3.34\pm0.13\text{ g/cm}^3$. The average distances of bone loss measured from cemento-enamel junction to alveolar bone crest in FimA-PVXCP and FimA vaccination groups (IM) were 0.176 ± 0.001 and 0.177 ± 0.001 mm respectively. Both groups had significantly lower average distances of bone loss than *P.g.* challenge control group ($p<0.05$). FimA-PVXCP (IM) group had bone loss distance to total root length ratio at $23.6\pm1.83\%$ which was lower than FimA (IM) group that had the ratio at $26.88\pm1.36\%$ ($p>0.05$).

Conclusion: FimA-PVXCP vaccination by IM induced specific serum IgG production against *Porphyromonas gingivalis* at comparable level to FimA vaccination (IM) at initial stimulating period and maintained the serum IgG level better than FimA vaccination (IM) at later period. FimA-PVXCP vaccine (IM) group was able to prevent alveolar bone loss equivalent to FimA vaccine (IM) group.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ดร.จันทร์ทิภา จบศรี ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ทุ่มเทสละเวลาอันมีค่ามาเป็นทั้งที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำช่วยเหลือ หาแหล่งทุนวิจัย ใส่ใจตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ทพญ.ดร. สดใส วิโรจนศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาด้านวิชาการที่คอยให้ช่วยเหลือ ผลักดัน ตลอดจนให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้รวมไปถึงประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ทพ.ดร.ไพบุลย์ จิตประเสริฐวงศ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ.ทพญ.ดร. สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ ขอขอบคุณทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) และทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ สำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2562 เพื่อเป็นทุนสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รวมไปถึงสัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุด โดยไม่มีเงื่อนไข และเป็นที่พิงใจยามท้อแท้เสมอ

ณัฐชัย สายวาริน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ	
ประกาศคุณูปการ.....ช	
สารบัญ.....ซ	
สารบัญตาราง.....ฅ	
สารบัญภาพ.....ฉ	
บทที่ 1 บทนำ.....1	
ความเป็นมาของปัญหา.....1	
คำถามการวิจัย.....3	
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3	
สมมติฐานของการวิจัย.....3	
ขอบเขตการวิจัย.....3	
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4	
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5	
เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส.....5	
ภูมิคุ้มกันวิทยาและวัคซีน.....8	
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....24	
ขั้นตอนในการทดลอง.....31	
1. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง.....31	

2. การกระตุ้นให้ติดเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส	32
3. การวิเคราะห์แอนติบอดี	33
4. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเบ้าฟัน	34
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	42
บทที่ 4 ผลการวิจัย	43
ผลการวิเคราะห์หาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฟิมเบรีย เอ ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนสจิงจิवालิสด้วยวิธีการอินไดเร็คเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (Indirect ELISA)	43
1. การสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี จำเพาะในซีรัม (IgG)	43
2. การสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ จำเพาะในน้ำลาย (IgA)	51
ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเบ้าฟัน	55
1. ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Percent BV/TV)	55
2. ความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD)	60
3. ระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน กับยอดของกระดูกเบ้าฟัน (Distance Cementoenamel junction (CEJ) – Alveolar bone crest (ABC))	64
4. ร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss)	68
บทที่ 5 บทสรุป	73
สรุปผลการวิจัย	74
อภิปรายผลการทดลอง	75
ข้อเสนอแนะ	90
บรรณานุกรม	91

ประวัติผู้วิจัย	98
-----------------------	----



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงปัจจัยก่อโรคและผลต่อร่างกายที่เกิดจากเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวาลิส...	6
ตาราง 2 แสดงชนิดของตัวรับเหมือนโกลรีในมนุษย์และโมเลกุลที่กระตุ้นตัวรับ.....	10
ตาราง 3 แสดงการสร้างภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวาลิส.....	16
ตาราง 4 แสดงจำนวนกลุ่มทดลองและจำนวนหนูที่ใช้ในการทดลอง.....	25
ตาราง 5 แสดงจำนวนกลุ่มทดลองและจำนวนหนูที่ใช้ในการทดลองย่อย	27
ตาราง 6 แสดงขั้นตอนการทดลองทั้งหมดในหนูทดลอง.....	40
ตาราง 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มการทดลองย่อยภายหลังจากกระตุ้นเพิ่มครั้งที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร.....	52
ตาราง 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มการทดลองหลัก ครั้งสุดท้ายก่อนการุณยฆาต (Final saliva) ภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 87 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร.....	53
ตาราง 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มการทดลองย่อย ครั้งสุดท้ายก่อนการุณยฆาต (Final saliva) ในวันที่ 115 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร.....	54
ตาราง 10 แสดงสรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกระดูกในแต่ละพารามิเตอร์.....	85
ตาราง 11 แสดงขนาดแท่งแฟนธอมที่แนะนำในการสอบเทียบค่าความหนาแน่นของกระดูก.....	88

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 แสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ	11
ภาพ 2 แสดงตำแหน่งต่างๆในการออกแบบวัคซีนที่ใช้เวกเตอร์ ที่มียืนเป็นรากฐาน (Gene based vector) หรือ ดีเอ็นเอวัคซีน (DNA vaccine)	13
ภาพ 3 แสดงการตอบสนองเมื่อพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าเซลล์.....	14
ภาพ 4 แสดงตำแหน่งต่างๆของพลาสมิดดีเอ็นเอ pcDNA3	23
ภาพ 5 แสดงวัคซีนดีเอ็นเอแต่ละแบบในพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 ที่ใช้ในการทดลอง	28
ภาพ 6 แสดงระยะเวลาในการศึกษาหนูทดลองในห้องปฏิบัติการของการทดลองหลัก ...	30
ภาพ 7 แสดงระยะเวลาในการศึกษาหนูทดลองในห้องปฏิบัติการของการทดลองย่อย	30
ภาพ 8 แสดงตำแหน่งและวิธีการฉีดวัคซีนเข้าสู่กล้ามเนื้อ.....	31
ภาพ 9 แสดงวิธีการหยดวัคซีนในหนูทดลอง	32
ภาพ 10 แสดงระนาบต่างๆในการเลือกบริเวณที่สนใจใช้ในการวิเคราะห์ผล	35
ภาพ 11 แสดงถึงขอบเขตบริเวณที่สนใจต้องการวิเคราะห์ (Region of interest, ROI) ใน การหาปริมาตรของกระดูก.....	36
ภาพ 12 แสดงถึงขอบเขตบริเวณที่สนใจต้องการวิเคราะห์ (Region of interest, ROI) ใน การหาความหนาแน่นของกระดูก.....	38
ภาพ 13 แสดงตำแหน่งการวัดระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูก.....	39
ภาพ 14 แสดงค่ามัธยฐานปริมาณแอนติบอดี IgG จำเพาะในซีรัม ภายหลังจากการกระตุ้น ภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 22 (ยูนิต/มิลลิลิตร)	44
ภาพ 15 แสดงค่ามัธยฐานปริมาณแอนติบอดี IgG จำเพาะในซีรัม ครึ่งสุดท้ายที่เก็บขณะ การณยฆาต(Final serum) ภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 87	47

ภาพ 16 แสดงค่ามัธยฐานปริมาณแอนติบอดี IgG จำเพาะในซีรัม ครั้งสุดท้ายที่เก็บขณะ การฉีดยา(Final serum) ของกลุ่มการทดลองย่อย ในวันที่ 115 (ยูนิต/มิลลิลิตร).....	50
ภาพ 17 แสดงค่ามัธยฐานร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Percent Bone volume/Total volume, BV/TV).....	58
ภาพ 18 แสดงค่ามัธยฐานร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด ของกลุ่มการ ทดลองย่อย,	59
ภาพ 19 แสดงค่ามัธยฐานความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD)...	62
ภาพ 20 แสดงค่ามัธยฐานความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD) ของ กลุ่ม การทดลองย่อย,.....	63
ภาพ 21 แสดงค่ามัธยฐานระยะเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและ เคลือบ รากฟันกับยอดของกระดูกเบ้าฟัน (Distance Cementoenamel junction – Alveolar bone crest).....	66
ภาพ 22 แสดงค่ามัธยฐานระยะเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและ เคลือบ รากฟันกับยอดของกระดูกเบ้าฟัน (Distance Cementoenamel junction – Alveolar Bone crest) ของกลุ่มการทดลองย่อย,	67
ภาพ 23 แสดงค่ามัธยฐานร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน	70
ภาพ 24 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน ของกลุ่ม การทดลองย่อย,	72
ภาพ 25 แสดงกลไกที่นำไปสู่การทำลายของกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบ	84

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

โรคปริทันต์อักเสบ(Periodontitis)หรือโรคคร่ามะนาดเป็นโรคเกี่ยวกับการอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียในไบโอฟิล์ม(Dental biofilm)ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะปริทันต์(Periodontium)ทั้งเหงือกและกระดูก ผลทางระบาดวิทยาพบโรคปริทันต์ (Periodontal disease) ในวัยผู้ใหญ่ถึงร้อยละ 10-15 ของประชากรโลก (P. E. Petersen & Ogawa, 2012) ถือเป็นโรคเรื้อรังที่สำคัญในระดับโลก ในประเทศไทยยังพบโรคปริทันต์อักเสบที่มีร่องลึกปริทันต์ (Periodontal pocket) ตั้งแต่ 6 มิลลิเมตรขึ้นไปในวัยทำงานและวัยสูงอายุร้อยละ 6.1 และ 12.2 ตามลำดับ (กรมอนามัย, 2560) อาการของโรคปริทันต์อักเสบคือเหงือกบวมแดง มีเลือดออก เอ็นยึดปริทันต์ถูกทำลายเกิดร่องลึกปริทันต์ กระดูกที่รองรับรากฟันถูกทำลายทำให้เกิดฟันโยก ท้ายที่สุดเป็นสาเหตุให้สูญเสียฟัน ส่งผลต่อการบดเคี้ยว การรับประทานอาหาร ความสวยงาม รวมถึงคุณภาพชีวิตที่แย่ลง นอกจากนี้โรคปริทันต์อักเสบยังส่งผลเชื่อมโยงสัมพันธ์กับโรคทางระบบ เช่น โรคเบาหวาน (Preshaw et al., 2012) โรคหัวใจและหลอดเลือด โรครูมาตอยด์ โรคกระดูกพรุน (Kinane & Marshall, 2001) ภาวะคลอดก่อนกำหนด (Teshome & Yitayeh, 2016)

สาเหตุการเกิดโรคปริทันต์อักเสบเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน ปัจจัยที่เป็นสาเหตุหลัก คือ การตอบสนองต่อการอักเสบของร่างกายต่อเชื้อจุลินทรีย์ในคราบจุลินทรีย์ซึ่งมีมากถึง 500-700 สปีชีส์อยู่เป็นกลุ่มสังคมนับว่ามีปฏิสัมพันธ์ส่งเสริมการคงอยู่และก่อโรค พบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสในคราบจุลินทรีย์(Dental plaque)ได้เหงือกได้ร้อยละ 85.75 ของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง (Yang, Huang, & Chou, 2004) ในปี 2012 Hajishengallis และคณะได้เสนอสมมุติฐานเชื้อก่อโรคที่เป็นกุญแจสำคัญ (Keystone pathogen) ในการขับเคลื่อนให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (Hajishengallis, Darveau, & Curtis, 2012) และหนึ่งใน Keystone pathogen ที่กล่าวถึงคือ พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ต่อมายังมีแนวคิดการส่งเสริมของเชื้อหลายชนิดร่วมกัน (Polymicrobial synergy and dysbiosis model, PSD model)ทำให้เกิดภาวะเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในช่องปาก (Hajishengallis & Lamont, 2012) การรักษาโรคปริทันต์อักเสบในปัจจุบันใช้การกำจัดเชื้อโรคด้วยการขูดหินน้ำลายเกลารากฟัน ร่วมกับการกำจัดปัจจัยร่วมอื่นๆที่ส่งผลต่อการเกิดโรค แต่พบว่าการกลับมาเกาะซ้ำของเชื้อก่อโรคในเวลาไม่กี่เดือน พบการกลับมาเกาะซ้ำของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ได้อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่เดือนที่ 6 หลังเกลารากฟัน (Octavia, Soeroso, Kemal, Sunarto, & Bachtar, 2018) การส่งเสริมภูมิคุ้มกันของร่างกายจึงเป็นแนวคิดในการป้องกันอีกแนวทางหนึ่ง ซึ่งเป็นที่มาของแนวคิดวัคซีนปริทันต์ พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส มีองค์ประกอบที่เป็นปัจจัยก่อโรคที่

มีส่วนกระตุ้นการตอบสนองของร่างกายและนำไปสู่การดำเนินของโรคปริทันต์อักเสบ เช่น แคปซูล (Capsule) เอนไซม์จิงจิเพน (Gingipain) ฟิมเบรีย (Fimbriae) ฯลฯ ปัจจัยก่อโรคที่ผู้วิจัยสนใจนำมาเป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ ฟิมเบรียยาว ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส ที่มีโมเลกุลหลักเป็นโครงสร้างคือ ฟิม เอ (FimA) ถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน FimA ซึ่งมีหน้าที่สำคัญต่อการยึดเกาะเซลล์ร่างกายและเชื้อแบคทีเรียตัวอื่น กระตุ้นการอักเสบทำให้เกิดการเหนี่ยวนำ การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์สื่ออักเสบ ยีน FimA แบ่งออกเป็น 6 จีโนไทป์ ได้แก่ ชนิดที่ 1-5 และ 1B ทำให้เกิดเป็นฟิมเบรียชนิดที่แตกต่างกัน หากมีการกำจัดฟิมเบรียได้จะทำให้เชื้อพอร์ไฟโรโมนัสไม่สามารถเกาะเซลล์ร่างกาย หรือแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นได้ และฟิมเบรียยังเป็นองค์ประกอบที่ผิวนอกสามารถถูกแอนติบอดีจับและกำจัดได้ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ฟิมเบรีย เอ ชนิดที่ 1 ซึ่งสามารถหาซื้อเชื้อที่มีฟิมเบรียชนิดที่ 1 นี้ได้และพบได้ในผู้เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ในการศึกษาวัคซีนดีเอ็นเอที่ผ่านมามีการใช้ฟิมเบรียเป็นแอนติเจน Yu และคณะ ในปี 2011 ใช้ FimA และไซโตทอกซิก ที ลิมโฟไซต์ ที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจน 4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA4) สร้างพลาสมิด CTLA4 เชื่อมต่อกับ FimA เพื่อพัฒนาวัคซีนดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อเซลล์เดนไดรติก พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม (Serum IgG) และอิมมูโนโกลบูลิน เอ ในน้ำลาย (Salivary IgA) ได้มากกว่าวัคซีนที่มี FimA อย่างเดียวและส่งผลต่อการทำลายของกระดูกขาขึ้นได้ การศึกษาวัคซีนดีเอ็นเอสำหรับโรคปริทันต์ที่ผ่านมายังมีข้อจำกัด มีการใช้โมเลกุลที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเสริมเข้าไปในวัคซีนดีเอ็นเอหรือใช้สารเสริมฤทธิ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีน แต่การศึกษายังจำกัดอยู่ในสัตว์ทดลอง

โปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของมันฝรั่ง (Potato virus X coat protein, PVXCP) เป็นโปรตีนจากไวรัสเอ็กซ์จากมันฝรั่ง ลักษณะเป็นเส้นใย ยืดหยุ่นได้ ซึ่ง PVXCP ได้ถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็นโมเลกุลที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในวัคซีนป้องกันเนื้องอก สามารถช่วยกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเฉพาะต่อต้านเนื้องอกผ่านทางเซลล์ทีเฮลเปอร์ (T helper cell, Th cell, CD4 T cell) และ PVXCP ยังสามารถรวมตัวกันเพิ่มความเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการตอบสนองของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ หรือ ที เซลล์ (T lymphocyte cell, T cell) อีกด้วย (Natalia Savelyeva, King, Vitetta, & Stevenson, 2005; N. Savelyeva, Munday, Spellerberg, Lomonosoff, & Stevenson, 2001) ได้มีการนำ PVXCP ไปใช้ในการทดลองในมนุษย์ เฟสที่ 1 ในผู้ป่วยมะเร็งต่อม้าน้ำเหลือง (Meleshko et al., 2017) ทำให้ PVXCP มีความน่าสนใจในการนำมาเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันในวัคซีนปริทันต์ ซึ่งยังไม่เคยมีการนำมาใช้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคปริทันต์ในมนุษย์มาก่อน งานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังที่จะพัฒนา

วัคซีนปรีทันต์ต้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ PVXCP ร่วมด้วย

คำถามการวิจัย

วัคซีนดีเอ็นเอต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีผลทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และสามารถป้องกันการละลายตัวของกระดูกเบาฟันหรือไม่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทดสอบความสามารถของวัคซีนต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ผลิตแอนติบอดีต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และผลการป้องกันการละลายตัวของกระดูกเบาฟัน

สมมติฐานของการวิจัย

วัคซีนดีเอ็นเอต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีผลทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และป้องกันการทำลายกระดูกเบาฟันโดยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

ขอบเขตการวิจัย

ในการศึกษานี้ศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนดีเอ็นเอต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ที่มีพิมเบรีย เอ ชนิดที่ 1 เชื่อมกับโปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของมันเป็นฝรั่ง โดยใช้พลาสมิด พีซีดีเอ็นเอ 3 โดยทำการทดลองในสัตว์ทดลอง คือ หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย การดำเนินการทดลองตั้งอยู่บนพื้นฐานของจริยธรรม คุณธรรม มนุษยธรรม ตามหลักวิชาการที่สถานสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ NUAE 600814 และใช้เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC® 33277™ โดยประสิทธิภาพของวัคซีนที่ศึกษา สามารถดูจากการป้องกันการทำลายของกระดูก และการเหนี่ยวนำกลไกป้องกันทางภูมิคุ้มกันวิทยาว่ามีการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA) และ อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ที่จำเพาะต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ซึ่งอาจแสดงถึงความสามารถในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันการเกิดเป็นโรคปรีทันต์อักเสบ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากวัคซีนนี้สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส และสามารถป้องกันการละลายตัวของกระดูกเข้าฟันได้ในสัตว์ทดลอง อาจนำไปสู่การวิจัยในคลินิกเพื่อหาความเป็นไปได้ในการผลิตเพื่อใช้เสริมสร้างภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคปริทันต์อักเสบในคนที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส

พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส เดิมชื่อ แบคทีเรียยีส จิงจิवालิส เป็นแบคทีเรียแกรมลบเจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจนเท่านั้น รูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่พบอยู่ในช่องปาก โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มสีแดง (Red complex) ที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent, 1998) ซึ่งถือว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาส และมีหลายการศึกษาที่บ่งชี้ว่าพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส เป็นเชื้อที่สำคัญในโรคปริทันต์อักเสบ กล่าวคือเป็นหนึ่งใน Keystone pathogen จากการศึกษาพบว่าหากเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส เพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นเพียงปริมาณเล็กน้อย น้อยกว่าร้อยละ 0.01 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดก็จะสามารถส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ดี (Pathobionts) เพิ่มจำนวนมากขึ้น เกิดภาวะไม่สมดุล หรือ Dysbiosis ทำให้สิ่งแวดล้อมเอื้อให้เหมาะกับแบคทีเรียที่ไม่ดี เกิดเป็นโรคปริทันต์อักเสบในที่สุด (Hajishengallis et al., 2012; Hajishengallis et al., 2011) ซึ่งสามารถพบ พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ได้มากถึงร้อยละ 85 ในตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ (Yang et al., 2004) ความสามารถของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส หากอยู่ในสิ่งแวดล้อมเหมาะสม คือในร่องลึกที่ไม่มีออกซิเจน มีส่วนที่สำคัญคือ ฮีม (Heme) ในน้ำเหลืองเหงือก (Gingival crevicular fluid, GCF) พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส สามารถดึงธาตุเหล็กจากร่างกายมนุษย์มาใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Hajishengallis, 2009, 2011) จากการศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ของร่างกายตอบสนองต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส พบว่า พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิสมีความสามารถในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกาย สามารถที่จะทนอยู่ได้และกระตุ้นให้อวัยวะปริทันต์เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง (Bostanci & Belibasakis, 2012; Hajishengallis, 2015)

โดยจะพบว่าพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิสมีปัจจัยก่อโรคมามากมายที่ส่งผลต่อการตอบสนองของร่างกาย ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังได้ ดังสรุปในตารางที่ 1 (How, Song, & Chan, 2016)

ตาราง 1 แสดงปัจจัยก่อโรคและผลต่อร่างกายที่เกิดจากเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส

ปัจจัยก่อโรค	ผลกระทบของการรุกรานต่อร่างกาย
เอนไซม์ (เอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส, คอนดรอยติน ซัลเฟต)	ลดกระบวนการฟาโกไซโทซิส จับกินทำลายเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอมที่รุกราน
แคปซูล	ยับยั้งการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว
ไลโปโพลีแซ็กคาไรด์	กระตุ้นกลาย, ทำลายอิมมูโนโกลบูลิน
ฟิมเบรีย, เอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์, โปรตีนด้านนอกของเยื่อหุ้ม	จับหรือยึดติดเยื่อหุ้มทางด้านนอกของร่างกาย
คอลลาจีเนส, โปรตีเอสที่มีสมบัติคล้ายทรูปซิน, เจลาติเนส	ทำให้ตัวยับยั้งโปรตีนในพลาสมาเสีย, ทำลายอวัยวะปริทันต์
อะมิโนเปปติเดส	ทำให้โปรตีนขนส่งหลักเสีย

จากตารางที่ 1 จะพบเอนไซม์ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส สามารถก่อโรคได้โดยจะมีเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ จิงจิเพน (Gingipain) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยพันธะเปปไทด์ หรือพันธะเอไมด์ ในสายโปรตีนซึ่ง Gingipain ประกอบไปด้วย อาร์จินิน และไลซีนที่เฉพาะเจาะจง (Arginine specific, Arg-X, lysine specific, Lys-X) ที่สามารถย่อยโมเลกุลต่างๆที่เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น แยกส่วนประกอบของโปรตีน ซีดี 2 (CD2), โปรตีน ซีดี 4 (CD4), โปรตีน ซีดี 8 (CD8) บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวและย่อยโปรตีนชนิด ไซโตไคน์สื่ออักเสบ (Proinflammatory cytokine) เช่น อินเตอร์ลิวคิน 12 (IL-12) อินเตอร์เฟียร์รอน แกมมา (IFN-gamma) อีกด้วย (Yun, Decarlo, Collyer, & Hunter, 2001) Lys-X gingipain ยังสามารถทำให้ตัวรับคอมพลีเมนต์ 5 เอ (C5a receptor) บนผิวของเซลล์โพลี มอโฟนิวเคลียร์ (Polymorphonuclear cells, PMNs) ไม่ทำงานและทำให้การเคลื่อนที่ของ PMNs ไม่ดี (Imamura, Banbula, Pereira, Travis, & Potempa, 2001; Wingrove et al., 1992) Arg-X gingipain สามารถสลายโมเลกุลคอมพลีเมนต์ ซี 3 (C3) ลดการจับเพื่อทำลายแบคทีเรียลง (Imamura et al., 2001) นอกจากนี้ Gingipain ยังรบกวนการหยุดของเลือดโดยไปทำลายไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ทำให้เลือดไหลมากขึ้นทำให้มีฮีโมโกลบินมากขึ้นเป็นแหล่งอาหารแก่พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสอีกด้วย

ไลโปโพลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีโครงสร้างแตกต่างจากโครงสร้างของ LPS ในแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่านตัวรับเหมือนทอลล์ 2 (Toll like receptor 2, TLR2) มากกว่าตัวรับเหมือนทอลล์ 4 (Toll like receptor 4, TLR4) ซึ่งนำไปสู่กระบวนการสร้าง Pro-inflammatory cytokine ส่งผลทำลายอวัยวะปริทันต์

ในส่วนของปัจจัยก่อโรค ที่สนใจคือฟิมเบรีย (Fimbriae) ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส Fimbriae ใช้ในการจับหรือยึดติดกับ โปรตีนในน้ำลาย แมทริกซ์ภายนอกเซลล์ เซลล์ของมนุษย์ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ Fimbriae ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มี 2 แบบคือ Fimbriae ชนิดหลัก และ Fimbriae ชนิดรอง Fimbriae ชนิดหลัก อาจเรียกว่า Fimbriae ยาว หรือ Fimbriae ชนิดที่ 1 มีความยาว 0.3-3 μm กว้าง 5 nm ประกอบไปด้วย โปรตีนฟิมบริลิน (Fimbrillin) ขนาด 41-49 กิโลดัลตัน (kDa) หลายโมเลกุลเป็นส่วนประกอบ ถูกถอดรหัสจากยีน FimA (Dickinson, Kubinieć, Yoshimura, & Genco, 1988) มีบทบาทในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนในตำแหน่งเป้าหมาย ส่วน Fimbriae ชนิดรองจะประกอบไปด้วยโปรตีนฟิมบริลิน (Fimbrillin) ขนาด 67 kDa หลายโมเลกุลเป็นส่วนประกอบ ซึ่งถูกถอดรหัสจากยีน เอ็มเอฟเอ 1 (Mfa1) หน้าที่นั้นยังไม่ชัดเจน แต่ปัจจุบันพบว่าฟิมเบรียชนิดรองมีความเกี่ยวข้องในการหลบหนีเข้าเซลล์ โดยฟิมเบรียชนิดรอง จะจับกับ DC-SIGN บนผิวของเดนไดรติกเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการนำเข้าสู่เซลล์ โดยเป็นการหลบหนีจากการจัดการของระบบภูมิคุ้มกัน (Amano, Nakagawa, Okahashi, & Hamada, 2004; Zenobia & Hajishengallis, 2015) เราสามารถแบ่งประเภทของฟิมเบรียโดยแยก จีโนไทป์ ของยีน FimA บน Fimbriae แบ่งออกเป็น 6 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 1B โดยแยกอยู่บนโลคัส (Locus) ของ FimA และ Mfa1 มีการเรียงตัวที่สามารถระบุตำแหน่งได้ ซึ่ง FimA และ Mfa1 เราทราบโครงสร้างยีนที่แน่นอน ในขณะที่ยีน ฟิม บี (FimB) หรือ เอ็มเอฟเอ 2 (Mfa2) ยังไม่ทราบแน่ชัด นอกจากนั้นยังมีอีก 3 ยีน ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนรองในฟิมเบรียยาว คือ ยีน ฟิม ซี (FimC), ฟิม ดี (FimD) และ ฟิม อี (FimE) ประกอบไปด้วยโปรตีนขนาด 50, 80 และ 19 kDa ตามลำดับหลายโมเลกุลในฟิมเบรียยาว (Amano, Nakagawa, Kataoka, Morisaki, & Hamada, 1999; Enersen, Nakano, & Amano, 2013) นอกจากนี้ฟิมเบรียยังสามารถส่งสัญญาณผ่านทางตัวรับเหมือนทอลล์ 2 (Toll-like receptor 2, TLR2) หรือตัวรับเหมือนทอลล์ 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) บนผิวเซลล์แมคโครฟาจทำให้ลดการสร้าง IL-12 FimA สามารถจับกับตัวรับเบต้า 1 อินทีกริน ($\beta 1$ integrin) บนเนื้อเยื่อบุผิวทำให้มีการเรียงตัวของโครงสร้างแอกติน (Actin) ใหม่ทำให้พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสเข้าไปภายในเซลล์ได้ โดยพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสามารถอยู่รอดและแบ่งตัวอยู่ภายในเซลล์รวมถึงกระตุ้นการแบ่งเซลล์เยื่อบุผิวด้วย อีกทั้งยังสามารถแพร่จากเซลล์ที่ติด

เชื้อไปยังเซลล์อื่นๆของร่างกายผ่านทางโครงร่างของเซลล์ ที่มีโปรตีนแอกตินสานกันไปมา (Bostanci & Belibasakis, 2012) และกีดการทำงานของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ส่งผลให้พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสสามารถรอดและทนจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้กระตุ้นการติดเชื้อในช่องปากได้อย่างเรื้อรัง

พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส มีความสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนำไปสู่สาเหตุการทำลายอวัยวะปริทันต์ และมีหลักฐานว่าเชื้อก่อโรคนั้นทำให้เกิดการอักเสบเฉพาะที่ โดยพบเซลล์ทีเฮลเปอร์ (Helper T cell, CD4 T cell), เซลล์ไซโตทอกซิก ที (Cytotoxic T cell, CD8 T cell) และเซลล์พลาสมา (Plasma cell) ได้ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่เป็นโรคปริทันต์ แต่ในสภาวะที่เป็นโรคปริทันต์จะพบ Plasma cell ในปริมาณที่สูงขึ้น และ LPS, gingipain จะไปกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ ที เอช1 (Th₁ cytokine) ได้แก่ IFN-gamma และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา (TNF- α) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อและกระดูกรอบๆรากฟัน (Teng, 2006) รวมไปถึงการแสดงออกของเซลล์ทีเฮลเปอร์เป็น เซลล์ทีเฮลเปอร์ 1 (T helper 1, Th1 cell) มากกว่าเซลล์ทีเฮลเปอร์ 2 (T helper 2, Th2) ทำให้นำไปสู่การอักเสบเรื้อรังและเนื้อเยื่อ และกระดูกรอบรากฟัน ถูกทำลายนำไปสู่โรคปริทันต์อักเสบอีกด้วย

แม้ว่าพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์เพื่อความอยู่รอดและเป็นเหตุให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อ แต่มีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีเฉพาะต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส มีผลป้องกันความเสียหาย โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออีแมกกลูทีนินของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ในห้องทดลอง (Kobayashi et al., 2004) ซิรั่ม IgG ต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ช่วยกำจัดแบคทีเรียและสามารถป้องกันการละลายตัวของกระดูกในหนูทดลองด้วย (Gibson, Gonzalez, Wong, & Genco, 2004)

ภูมิคุ้มกันวิทยาและวัคซีน

ระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immunity)

2.1) ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด มีความจำเพาะเจาะจงน้อย (Less specificity) ไม่มีความจำ (Memory) แต่สามารถตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว เป็นด่านแรกของระบบภูมิคุ้มกัน มีกายวิภาคเป็นด่านป้องกันทางกายภาพ เช่น ผิวหนัง เนื้อเยื่อบุผิว (Epithelium) ซีเลีย (Cilia) การป้องกันทางเคมี เช่น กรดในกระเพาะอาหาร เอนไซม์ในลำไส้ รวมไปถึงสามารถฆ่าเชื้อโรคได้เฉพาะที่ โดยผลิตเปปไทด์ต้านจุลชีพ (Peptide antibiotic) ที่ออกฤทธิ์กว้าง เช่น เนื้อเยื่อบุผิวสามารถหลั่ง เบต้า ดีเฟนซิน

2 (Beta defensin 2) และ แคทีลิกซิน (Cathelicidin) ในการกำจัดเชื้อโรค เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) ได้แก่ แมกโครฟาจ (Macrophage), เซลล์เดนไดรติก (Dendritic cell), นิวโทรฟิล (Neutrophil), อีโอซิโนฟิล (Eosinophil) และโมโนไซต์ (Monocyte) โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะมีตัวรับที่ใช้จับกับส่วนของเชื้อก่อโรคเรียกว่า ตัวรับจดจำรูปแบบ (Pattern-recognition receptor, PRR) ในกลุ่มของ PRR ทั้งหมด PRR ที่มีความสำคัญมากคือ ตัวรับเหมือนทอลล์ (Toll-like receptor, TLR) ซึ่งสามารถจับกับชิ้นส่วนของเชื้อที่ก่อโรคที่เรียกว่า รูปแบบโครงสร้างโมเลกุลตามธรรมชาติของสิ่งแปลกปลอม (Pathogen associated molecular pattern, PAMPs) โดยจับกับเชื้อได้อย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006)

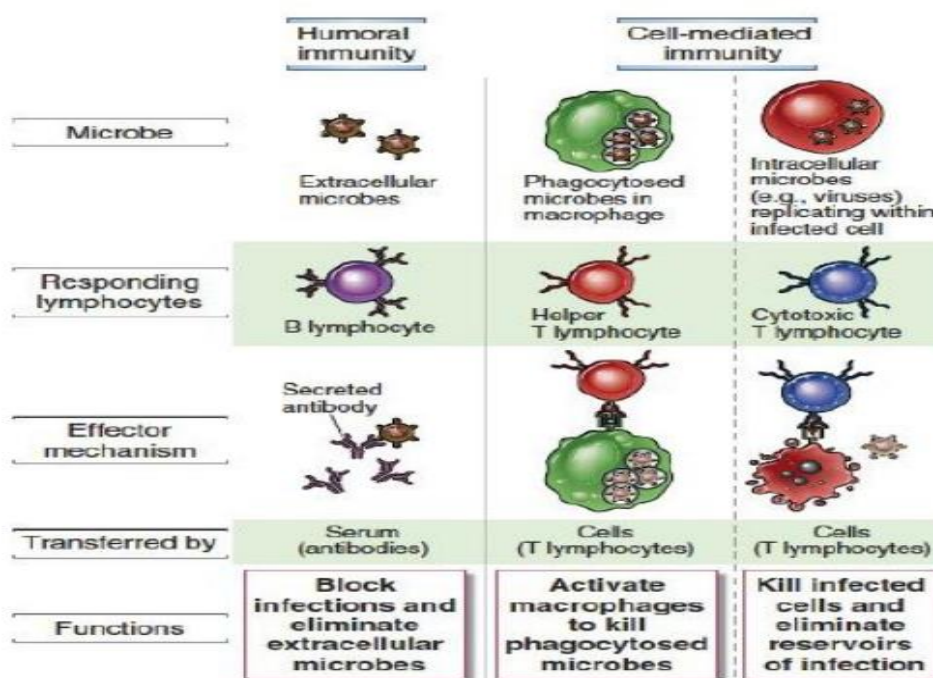
ตัวรับเหมือนทอลล์ (Toll-like receptor, TLR) เป็นตัวรับที่อยู่ทั้งที่ผนังเซลล์ และภายในเซลล์ ในมนุษย์พบอยู่ด้วยกัน 10 ชนิด โดยชนิดที่ 1,2,4,5 และ 6 อยู่ที่ผนังเซลล์ ส่วนใหญ่จับกับแบคทีเรียชนิดที่ 3,7,8 และ 9 อยู่ภายในเซลล์ ส่วนใหญ่จับกับไวรัส และกรดนิวคลีอิก ชนิดที่ 11-13 พบในหนู สรุปลักษณะตัวรับเหมือนทอลล์ แสดงตารางที่ 2 (ฉัตรชาติ, 2558)

ตาราง 2 แสดงชนิดของตัวรับเหมือนโกล์ในมนุษย์และโมเลกุลที่กระตุ้นตัวรับ

ตัวรับเหมือนโกล์	ไลแกนด์	ชิ้นส่วนจุลชีพที่กระตุ้น
ตัวรับเหมือนโกล์ 1	ไลโปโปรตีน, กรดไลโปไทโคอิก	แบคทีเรียแกรมบวก, ไมโครพลาสมา
ตัวรับเหมือนโกล์ 2	ไลโปโปรตีน, เพปไทด์ไกลแคน, กรดไลโปไทโคอิก, ไซ โมซาน, ไลโปอะ-รามิ โนแมนแนน	ผนังเซลล์แบคทีเรีย, ไมโครพลาสมา, ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก, เห็ดรา, ผนังเซลล์ไมโครแบคทีเรีย
ตัวรับเหมือนโกล์ 3	อาร์เอ็นเอ สายคู่	ไวรัสอาร์เอ็นเอ
ตัวรับเหมือนโกล์ 4	เอนโดท็อกซิน,	ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ , ไวรัสอาร์ เอส วี
ตัวรับเหมือนโกล์ 5	แฟลกเจลลิน	แบคทีเรีย
ตัวรับเหมือนโกล์ 6	ไลโปโปรตีน, กรดไลโปไทโคอิก	แบคทีเรียแกรมบวก, ไมโครพลาสมา
ตัวรับเหมือนโกล์ 7	อาร์เอ็นเอ สายเดี่ยว	ไวรัสอาร์เอ็นเอ
ตัวรับเหมือนโกล์ 8	อาร์เอ็นเอ สายเดี่ยว	ไวรัสอาร์เอ็นเอ
ตัวรับเหมือนโกล์ 9	ดีเอ็นเอ ซีพีจี	แบคทีเรีย และไวรัสอาร์เอ็นเอ
ตัวรับเหมือนโกล์ 10	ไม่ทราบแน่ชัด	ไม่ทราบแน่ชัด

เนื่องจากเชื้อก่อโรคมีเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง จากการเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ได้อย่างหลากหลาย ทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดไม่สามารถป้องกันร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะมีข้อจำกัดจากการที่ PRR ไม่มีความหลากหลายมากนัก (Bowie & Unterholzner, 2008)

2.2) ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immunity) มีลักษณะจำเพาะเจาะจงสูง คือ เซลล์ทีลิมโฟไซต์ หรือ ที เซลล์ (T lymphocyte cell, T cell) ,เซลล์บีลิมโฟไซต์ หรือ บี เซลล์ (B lymphocyte cell, B cell) มีตัวรับ (Receptor) ในแต่ละโคลน (Clone) สามารถจับกับ แอนติเจนได้ชนิดเดียว มีความจำเพาะมากกว่าภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) อีกทั้งมีความสามารถจดจำโครงสร้างของแอนติเจนได้หลากหลาย และสามารถจดจำ (Immunological memory) สร้างภูมิคุ้มกันระยะยาว ตอบสนองเมื่อมีการติดเชื้ออีกครั้ง รวมถึงมีคุณสมบัติในการ แยกแยะเซลล์ของร่างกายและเชื้อโรค (Self-nonself recognition) มีความเกี่ยวข้องกับโรคภูมิ ต้านทานเนื้อเยื่อของตนเอง การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะตอบสนองได้ 2 แบบทั้งการ ตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (Humoral immune response) และการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immune response) การตอบสนองโดยใช้สารน้ำจะเกี่ยวข้องกับแอนติบอดี ตอบสนอง ต่อจุลชีพนอกเซลล์ (Extracellular microbe)ผ่านได้ทั้งกลไกการตอบสนองไม่พึ่งพา ที เซลล์ (T cell independent response) และการตอบสนองพึ่งพา ที เซลล์ (T cell dependent response) ซึ่ง ถ้าผ่าน T cell จะเป็นการกระตุ้นผ่านทั้ง T cell เหนี่ยวนำให้ B cell ผ่านกระบวนการต่างๆในเจอร์ มินัล เซ็นเตอร์ (Central germinal) ส่งผลให้มี บี เซลล์หน่วยความจำ (Memory B cell) ไว้สำหรับการ ตอบสนองภูมิคุ้มกันทุติยภูมิ (Secondary immune response) ส่วนการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immune response) ตอบสนองต่อจุลชีพในเซลล์ (Intracellular microbe)ผ่าน ทาง T lymphocyte ดังภาพที่ 1 (Abbas, 2018)



ภาพ 1 แสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

กลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย แบ่งออกเป็นการได้รับแอนติเจน หรือวัคซีน แบบปฐมภูมิ (Primary immune response) โดยร่างกายจะตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีขึ้น และการตอบสนองแบบทุติยภูมิ (Secondary immune response) ซึ่งร่างกายสามารถสร้างแอนติบอดีได้จำนวนมาก และรวดเร็วขึ้น

วัคซีน เป็นชีววัตถุที่เตรียมขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์หรือส่วนของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะมีกลไกชักนำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ กล่าวคือมีฤทธิ์ชักนำการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ วัคซีนโดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนประกอบของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค ซึ่งถูกทำให้อ่อนฤทธิ์ลง, ตาย หรือการใช้ส่วนที่เป็นพิษที่อ่อนฤทธิ์ลง (Toxoid) โดยวัคซีนจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและสามารถจดจำได้ว่าเป็นเชื้อก่อโรคซึ่งจะมีกลไกการทำลายต่อไป คุณสมบัติการจดจำแอนติเจนของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ร่างกายสามารถตอบสนองแบบ Secondary immune response ต่อแอนติเจนหากเมื่อได้รับภายหลังได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

เทคนิคการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค สามารถแบ่งได้หลายแบบ หากแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์สามารถแบ่งออกได้ดังนี้ (Happy, Hadge, Khopade, Sayyed, & Sable, 2013; Kudyar, Dani, & Mahale, 2011; Kumar, B, Dutt, & Gupta, 2014; Shiva Manjunath et al., 2015; Thomas George, George, John, & Thomas, 2015)

- 1) การสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคเอง (Active immunization) คือการให้แอนติเจน เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันเอง โดยภูมิคุ้มกันจะเกิดภายหลังการให้วัคซีน หรือภายหลังติดเชื้อธรรมชาติ ต้องใช้เวลาในการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรค ภูมิคุ้มกันอยู่ในร่างกายได้นาน เช่น แบททีเรียทั้งเซลล์ เปปไทด์ที่สร้างขึ้นเป็นแอนติเจน เป็นต้น
- 2) การสร้างเสริมภูมิคุ้มกันจากการได้รับภูมิคุ้มกันโดยตรง (Passive immunization) คือ การให้แอนติบอดีหรือภูมิคุ้มกันต่อโรคเพื่อไม่ให้เกิดโรค โดยจะเกิดภูมิคุ้มกันภายหลังการให้อิมมูโนโกลบูลิน แอนตี้ท็อกซิน สามารถป้องกันโรคได้ทันที ร่างกายไม่จดจำเชื้อโรค ภูมิคุ้มกันอยู่ได้ไม่นาน เช่น โมโนโคลนอล แอนติบอดีจากหนู แอนติบอดีจากพืช เป็นต้น

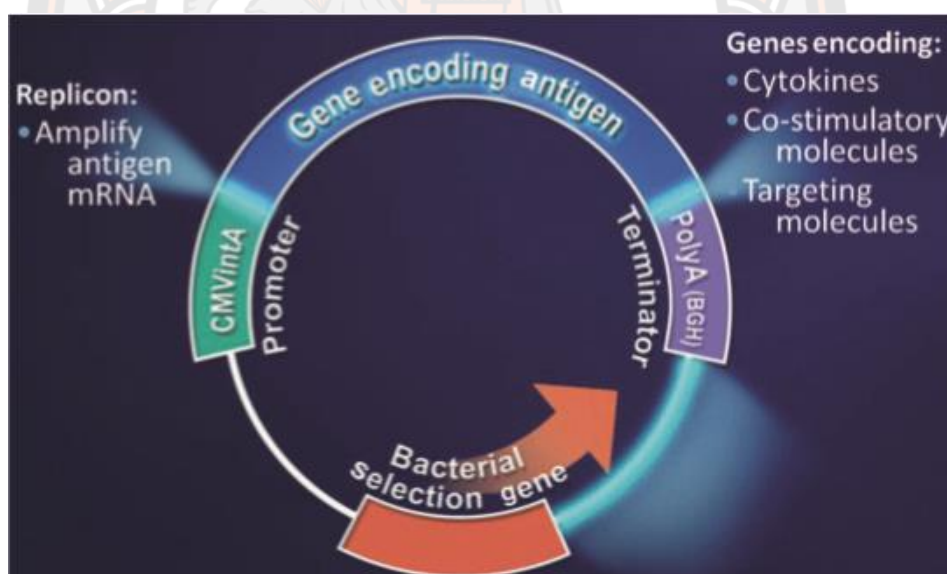
จุดประสงค์ในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันด้วยการให้วัคซีน สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. วัคซีนป้องกันโรค (Preventive vaccine) คือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการเป็นโรค ทำในกลุ่มเป้าหมายที่ยังไม่เกิดโรครุนแรง อาจอยู่ในกลุ่มเสี่ยงหรือป้องกันโรคที่อาจเกิดขึ้นรวมไปถึงโรคระบาด ซึ่งวัคซีนส่วนใหญ่มีเป้าหมายเพื่อการป้องกันโรค สามารถออกแบบการให้วัคซีนแบ่งเป็นให้หลายครั้งตามโดสที่กำหนด แล้วแต่รูปแบบ กลไกการออกแบบของวัคซีน

เช่น วัคซีนป้องกันคอตีบ วัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูก วัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี (Hepatitis B) เป็นต้น

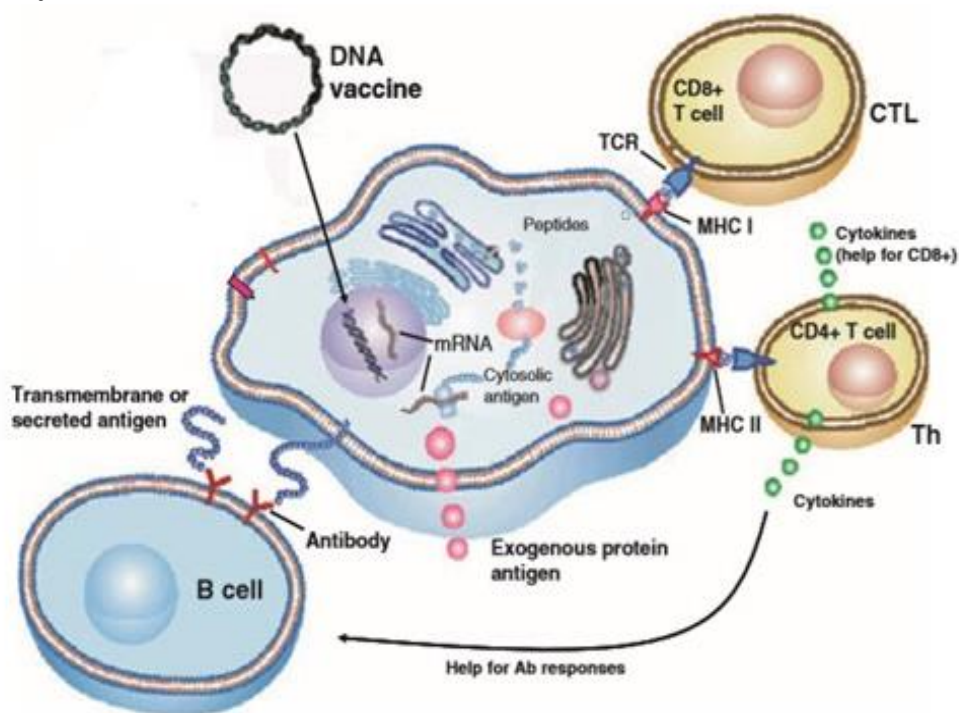
2. วัคซีนรักษาโรค (Therapeutic vaccine) คือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังจากที่ได้รับเชื้อ หรือเป็นโรคแล้ว โดยมุ่งหวังให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันได้มากขึ้น อาจมีการใช้การรักษาด้วยวิธีอื่นร่วมด้วย ได้แก่ วัคซีนวัณโรค วัคซีนเอชไอวี เป็นต้น ซึ่งทั้ง 2 วัคซีนนี้มีทั้งแบบที่เป็นวัคซีนป้องกันและรักษา

จากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์และความรู้ด้านชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์ทางการแพทย์จึงนำไปสู่การสร้างภูมิคุ้มกันโรค ด้วยการใช้พลาสมิดวัคซีน หรือดีเอ็นเอวัคซีน ซึ่งจะประกอบไปด้วยโครงร่างพลาสมิด ดีเอ็นเอ ยีนของแอนติเจนที่สนใจ และโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออก โดยพลาสมิดดีเอ็นเอวัคซีนสามารถที่จะออกแบบยีนที่ต้องการได้ อาจเลือกยีนที่ควบคุมโปรตีนหรือแอนติเจนที่สนใจ สามารถใส่ไซโตไคน์ หรือโมเลกุลที่ช่วยกระตุ้นได้อย่างเหมาะสม ดังภาพที่ 2 (Liu, 2011)



ภาพ 2 แสดงตำแหน่งต่างๆในการออกแบบวัคซีนที่ใช้เวกเตอร์ ที่มียีนเป็นรากฐาน (Gene based vector) หรือ ดีเอ็นเอวัคซีน (DNA vaccine)

ดีเอ็นเอวัคซีนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้ เป็นการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ โดยมี เซลล์นำเสนอแอนติเจน (Antigen presenting cell) คือ Dendritic cell เป็นเซลล์เป้าหมายในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เมื่อดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่นิวเคลียสของ Dendritic cell และมีการสร้างโปรตีนแอนติเจนออกมา จะถูกนำเสนอผ่านเอ็ม เอช ซี คลาส 1 (Major histocompatibility complex class I, MHC I) ในการกระตุ้น Cytolytic T lymphocyte ให้ไปจัดการกับแอนติเจนเป็นการกระตุ้นผ่านการตอบสนองภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immunity) อีกทั้งสามารถกระตุ้น Helper T cell ด้วยการนำเสนอโปรตีนแอนติเจนผ่านทาง MHC II แล้วทำให้ Helper T cell หลั่ง Cytokine ให้ B cell ตอบสนองต่อแอนติเจนด้วยการสร้างแอนติบอดี เป็นการกระตุ้นผ่านการตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยการใช้สารน้ำ (Humoral immunity) ดังภาพที่ 3 (Liu, 2011)



ภาพ 3 แสดงการตอบสนองเมื่อพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าเซลล์

ข้อดีของวัคซีนดีเอ็นเอนอกจากสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะเจาะจงทั้งชนิด Helper T cells และ Cytolytic T lymphocytes (CTLs) โดยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนได้โดยตรงจากยีนหรือสายเบสนิวคลีโอไทด์แล้ว ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการใช้เชื้อก่อโรคที่เป็นอันตรายจากการทำให้เชื้ออ่อนแรง มีความปลอดภัยในการนำมาใช้ สามารถใช้เทคนิคในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้หลายวิธี อาจมีข้อจำกัดเรื่องความเร็วในการสร้างและผลิตวัคซีนในปริมาณมาก (ศุภพิตร, 2558)

วัคซีนที่ใช้ในทางปริทันต์ เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีเชื้อแบคทีเรียหลายตัวในคราบจุลินทรีย์ร่วมกันในการก่อโรค (Polymicrobial infection) ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำคัญอย่างหนึ่งในการคิดค้นวัคซีนเพื่อรักษาโรคปริทันต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอดีตนักวิจัยมีการติกรอบในการศึกษาแบคทีเรียที่สำคัญอยู่ 6-7 สายพันธุ์ ได้แก่ พอร์ไฟโรโมนแนส จิงจิवालิส, ทรีโพนิมา เดนทิกอล่า (*Treponema denticola*) , แทนเนอเรลลา ฟอร์ซัยเธีย (*Tannerella forsythia*), แอกริเกติบาคเตอร์ แอคติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), พริวเวลล้า อินเตอร์มีเดีย (*Prevotella intermedia*), แคมไพโรแบคเตอร์ เรคตัส (*Campylobacter rectus*), และ ฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม (*Fusobacterium nucleatum*) มีทั้งการให้แบบ Active immunization และ Passive immunization โดยมุ่งไปที่ พอร์ไฟโรโมนแนส จิงจิवालิส และ แอกริเกติบาคเตอร์ แอคติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ เป็นหลัก ในส่วนของเชื้อพอร์ไฟโรโมนแนส จิงจิवालิส มี Virulence factor มากมายที่สามารถเลือกมาเป็นแอนติเจนได้ การศึกษาวัคซีนปริทันต์เริ่มต้นจากการศึกษาโดยใช้เชื้อทั้งเซลล์มาทำวัคซีน (Inactivated whole-cell vaccines) ผ่านความร้อน หรือ ฟอมาลีน โดยพบว่าการยับยั้งโรคปริทันต์อักเสบ พบ serum IgG และ IgA ที่เพิ่มขึ้นช่วยเพิ่มความสามารถในการจับและฆ่าเชื้อโรคของวัคซีน (Opsonophagocytic activity) ในลิงแสมสายพันธุ์ Macaca fascicularis (Houston, Lukehart, Persson, & Page, 1999; Persson et al., 1994) หากเปรียบเทียบระหว่างการให้ความร้อนและใช้ฟอมาลีน พบว่าการให้ความร้อนจะมีการสร้างแอนติบอดีที่ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายังไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นการป้องกันโรคปริทันต์อักเสบอย่างสมบูรณ์ (Ebersole, Bauman, Cox O'Dell, & Giardino, 1997) มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยมีการใช้แอนติเจนที่จำเพาะมากขึ้นของพอร์ไฟโรโมนแนส จิงจิवालิส เช่น แคปซูล, LPS, ฟิมเบรีย, จิงจิเพน (Gingipains) และฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin) เป็นต้น มาเป็นแอนติเจนในการทำวัคซีน ตามตารางที่ 3 (Jong & van der Reijden, 2010)

ตาราง 3 แสดงการสร้างภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

ชนิดของแอนติเจน	การปรับปรุงนำไปใช้	พลาสมิดโครงสร้างหลัก	เทคนิคที่ใช้กระตุ้น	สัตว์ทดลอง	ผลการทดลอง
แคปซูล	ใช้ Capsular polysaccharide (CPS) ทั้งหมด	-	ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	หนูเมาส์ BALB/c	ค่าไตเตอร์แอนติบอดี IgG จำเพาะต่อ CPS และ IgM สูงขึ้น
	โพลีแซ็กคาไรด์เชื่อมต่อกับบีเอสเอ	-	ฉีดเข้าเยื่อช่องท้อง	หนูเมาส์ BALB/c	เหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีในซีรัมและความรุนแรงในการติดเชื้อ <i>P.g.</i> ลดลง
	โพลีแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมต่อกับโปรตีนฟิมเบรีย	-	ฉีดเข้าเยื่อช่องท้อง	หนูเมาส์ BALB/c	ซีรัม IgG สูงขึ้น และสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกระตุ้นด้วย CPS หรือ ฟิมเบรียเพียงอย่างเดียว
แอลพีเอส	แอลพีเอส	-	ฉีดเข้าเยื่อช่องท้อง	หนูเมาส์ BALB/c	ไม่เหนี่ยวนำการสร้าง IgG ในซีรัม มีการกระตุ้นลิ้มโฟไซด์ต่อต้านการติดเชื้อ <i>P.g.</i>
	แอลพีเอส/ศึกษาการตอบสนองต่อโดส	-	ฉีดเข้าเยื่อช่องท้อง	หนูเมาส์ BALB/c	ไม่ตอบสนองต่อแอนติเจนที่จำเพาะ

ชนิดของแอนติเจน	การปรับปรุงนำไปใช้	พลาสมิดโครงสร้างหลัก	เทคนิคที่ใช้กระตุ้น	สัตว์ทดลอง	ผลการทดลอง
จิงจิเพน	ซิสเทอีนโปรทีเอส ที่ทำให้บริสุทธิ์	-	ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	ลิงกัง	เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IgG ในซีรัม และลดปริมาณ P.g. ในคราบจุลินทรีย์ได้เหนือกว่าระยะเวลา และการดำเนินโรคถูกยับยั้ง
	อาร์จีพีเอ, อาร์จีพีบี, เชื้อ P.g. ถูกทำให้อ่อนแรงด้วยความร้อน	-	ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	หนูเมาส์ BALB/c	ทุกกลุ่มกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IgG จำเพาะในซีรัมแต่มีเพียง อาร์จีพีเอ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการป้องกันการละลายตัวของกระดูก
ดีเอ็นเอวัคซีนอาร์จีพีเอ (rgpA DNA vaccine)	Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector kit	หยุดทางจมูก, ฉีดเข้าชั้นผิวหนัง (Intradermal)	หนูเมาส์ BALB/c	กลุ่มที่หยุดวัคซีนทางจมูกพบปริมาณซีรัม IgG สูงขึ้น และพบ IgA ในน้ำลาย มีการทำลายตัวของกระดูก ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มฉีดเข้าชั้นผิวหนัง	
ดีเอ็นเอวัคซีนอาร์จีพีเอ(rgpA DNA vaccine)	pVAX1	ฉีดเข้าชั้นผิวหนัง	หนูเมาส์ BALB/c	ลดการตายจากการติดเชื้อโดยโดสที่ถึงชีวิตของ P.g.	

ชนิดของแอนติเจน	การปรับปรุงนำไปใช้	พลาสมิดโครงสร้างหลัก	เทคนิคที่ใช้กระตุ้น	สัตว์ทดลอง	ผลการทดลอง
	ดีเอ็นเอวัคซีนลิสงิงจิเพน (Lys- gingipain DNA vaccine)	pSecTag2A และ pSecTag2B	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ	หนูเมาส์ BALB/c	ป้องกันการตอบสนองการอักเสบพบซีรัม IgG และพบว่าอยู่นานขึ้น
พิมเบรีย	พิมเบรีย และแอนติบอดีจำเพาะต่อพิมเบรีย	-	ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	หนูแรท	ปกป้องการทำลายอวัยวะปริทันต์
	พิมเบรีย ชนิดที่1 ที่ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียส	-	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	กระต่าย	เหนี่ยวนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีให้จับไกล่เกลี่ยสเตรนของพิมเบรีย
	วัคซีน FimA และวัคซีน FimAที่มีการแสดงออกของ IL-15	pIRES	ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, หยอดวัคซีนทางจมูก	หนูเมาส์ BALB/c	การกระตุ้นทั้งทางกล้ามเนื้อและจมูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IgG จำเพาะในซีรัม มีเพียงเทคนิคการหยดทางจมูกที่ทำให้เกิดการสร้าง IgA ในน้ำลายซึ่งมาจากการมี IL-15 เป็นตัวช่วยเสริมฤทธิ์ของดีเอ็นเอวัคซีน

ชนิดของแอนติเจน	การปรับปรุงนำไปใช้	พลาสมิดโครงสร้างหลัก	เทคนิคที่ใช้กระตุ้น	สัตว์ทดลอง	ผลการทดลอง
	วัคซีน FimA	pcDNA3	ฉีดเข้าไปที่ต่อมน้ำลาย	หนูเมาส์ BALB/c	กระตุ้นให้เกิดการสร้าง IgG, IgA ในน้ำลายและ IgG ในซีรัม
	ดีเอ็นเอวัคซีน FimA	เวกเตอร์ <i>Streptococcus gordonii</i>	ทางปาก	หนูแรท	ช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IgG, IgA จำเพาะในซีรัม และ IgA ในน้ำลาย
โปรตีนเยื่อหุ้มด้านนอก	โปรตีนเหมือน OmpA	-	ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	หนูเมาส์ BALB/c	ลดขนาดของรอยโรคและเหนี่ยวนำให้เกิดการป้องกันต่อต้านเชื้อ <i>P.g.</i>
	Anti-r40-kDa OMP hMAB	-	ทางปาก	หนูแรท	ปกป้องต่อต้านเชื้อ <i>P.g.</i> ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการละลายตัวของกระดูก
ฮีแมกกลูตินิน	rHagB	-	ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง	หนูแรท	ไม่พบ IgA จำเพาะต่อ HagB พบปริมาณ IgM สูงขึ้นเล็กน้อย ขณะที่พบ IgG ในซีรัมช่วยป้องกันการละลายตัวของกระดูก

ชนิดของแอนติเจน	การปรับปรุงนำไปใช้	พลาสมิดโครงสร้างหลัก	เทคนิคที่ใช้กระตุ้น	สัตว์ทดลอง	ผลการทดลอง
	rHagB เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ โมโนฟอสโฟลิไลป์ด เอ (MPL)	-	หยดทางจมูก	หนูเม้าส์ BALB/c	พบ IgA จำเพาะต่อ HagB เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในน้ำลาย และพบ IgG ในซีรัม เมื่อเทียบกับให้ rHagB เพียงอย่างเดียว

ฟิมเบรีย เป็นแอนติเจนหนึ่งที่เป็นตัวเลือกและมีคนศึกษามากมาย การใช้ฟิมเบรียสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีช่วยในการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) โดยยีนฟิม เอ ชนิดที่ 1 (FimA type I) บนสายสเตรน ของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส หรือ การสังเคราะห์ชิ้นส่วนเปปไทด์ของ FimA type I สามารถทำให้เกิดการทำงานของ การเคลื่อนเหตุสารเคมี (Chemotaxis) กระตุ้นการผลิต Pro-inflammatory cytokine เช่น Tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukins 1, 6, 8 (IL-1,6,8) และยังสามารถส่งเสริมการทำงานของ Hemagglutinin ของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิสเองอีกด้วย (Lucchese et al., 2013) ฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิสช่วยในการยึดเกาะในช่องปาก รวมไปถึงโมเลกุลในน้ำลาย เช่น โพรลีนริชโปรตีน (Proline-rich proteins), โพรลีนริชไกลโคโปรตีน (Proline-rich glycoproteins), โพรตีน สตาเทริน (Statherins), ไฟบรีโนเจน (Fibrinogen), ไฟโบรเนกติน (Fibronectin), แลคโตเฟอริน (Lactoferrin) อีกทั้งยังสามารถเกาะกับแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันอย่างกลุ่มสเตรปโทคอกคัสในช่องปาก (Oral *Streptococci*) และกลุ่มสปีชีส์ของแอคติโนมัยซีทีท (*Actinomyces species*) รวมถึงสามารถเกาะกับเนื้อเยื่อในช่องปากได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Fimbriae เป็นตัวเลือกที่ดี ที่นำมาทำเป็นแอนติเจนในการผลิตวัคซีน สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันสูง และยังเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการเกาะเซลล์ร่างกาย (Grover, Kapoor, Malhotra, & Kaur, 2014) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้าน FimA ชนิดที่ 1 ของ พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส สามารถปิดกั้นการยึดเกาะเซลล์เยื่อผิวแก้มของมนุษย์ได้ (Isogai et al., 1988; Koh, Kim, Lee, & Kim, 2009) ยิ่งไปกว่านั้นมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองด้วย

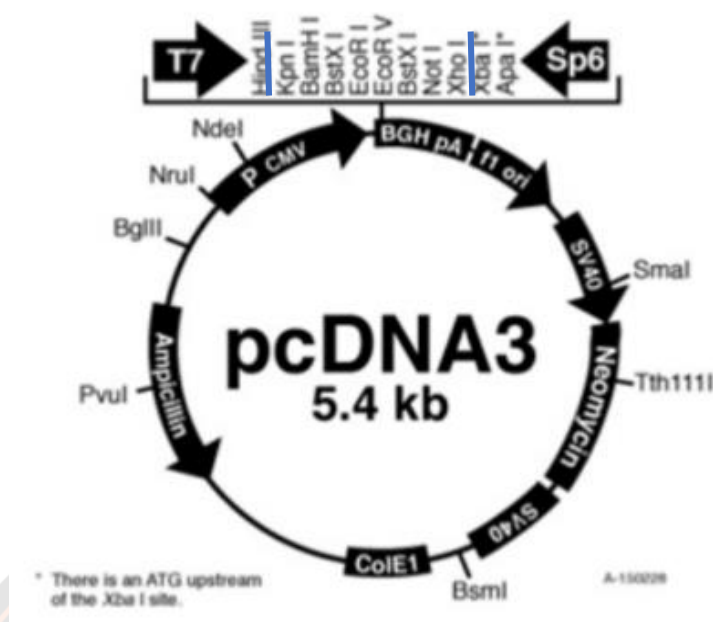
พืชมเบรียที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส หรือ เปปไทด์พืชมเบรียสังเคราะห์ พบการเหนี่ยวนำให้เกิดการป้องกันทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นสามารถต่อต้านการทำลายอวัยวะปริทันต์ (Lucchese et al., 2013; Ogawa, Ogo, Uchida, & Hamada, 1994)

พืชมเบรียที่ถูกนำมาใช้ในรูปแบบดีเอ็นเอวัคซีนถูกศึกษาโดย Guo และคณะ ใช้วิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางจมูก (Intranasal immunization, i.n.) หรือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular immunization, i.m.) ด้วยพลาสมิด pIRES ที่เชื่อมต่อกับ FimA (pIRES-fimA) หรือตัวแสดงออกร่วม คือพลาสมิด pIRES ที่เชื่อมต่อกับ FimA และมีตัวแสดงออกร่วมคือ IL-15 (pIRES-fimA:IL-15) ซึ่ง IL-15 เป็นตัวช่วยเสริมฤทธิ์ของวัคซีน เป็นไซโตไคน์ช่วยในการเรียก นิวโทรฟิลมายังบริเวณนั้น หลังจากการทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทั้ง 2 วิธีพบว่า มีแอนติบอดีจำเพาะ IgG ต่อพืชมเบรีย ชนิดที่ 1 ในเลือดเพิ่มขึ้น (FimA-specific IgG antibodies)(Guo, Wang, Jiang, & Yang, 2006) ในปี ค.ศ. 1999 Kawabata และคณะได้ทดสอบให้ดีเอ็นเอวัคซีนต่อพืชมเบรีย เอ (FimA) ชนิดที่ 1 โดยใช้ พลาสมิด pcDNA3/fimA ฉีดเข้าสู่ต่อมน้ำลายของหนู BALB/c พบ IgG, IgA ที่จำเพาะต่อ Fimbriae ในน้ำลาย และ IgG ในเซรัมของหนูที่ให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันไป (Kawabata, Terao, Fujiwara, Nakagawa, & Hamada, 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Sharma และคณะศึกษาโดยใช้ Epitope ของพืชมเบรีย เอ ตัดต่อใส่ในเวกเตอร์ สเตรปโทคอกคัส กอร์โดเนีย (Streptococcus gordonii recombinant) ทำการให้วัคซีนทางปากในหนูทดลอง พบว่ามีการสร้าง FimA-specific serum IgG and IgA และ salivary IgA antibodies ซึ่งสามารถป้องกันเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายของกระดูก (Sharma, Honma, Evans, Hruby, & Genco, 2001) คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Yu และคณะ พบว่าดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับพืชมเบรีย เอ (FimA) ชนิดที่ 1 เชื่อมกับ ไซโตทอกซิกทีลิมโฟไซด์ที่เกี่ยวข้องกับ แอนติเจน 4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4) ของหนู เหนี่ยวนำการสร้าง IgG ในเซรัม และ IgA ในน้ำลายที่จำเพาะ และวัคซีนป้องกันการทำลายของกระดูก หลังจากใส่เชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในหนูทดลองเช่นกัน (Yu, Xu, & Chen, 2011)

จากการทบทวนศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการพยายามปรับปรุงออกแบบวัคซีนทั้งการใส่ตัวแสดงออกร่วมในพลาสมิดเพื่อช่วยกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันของร่างกาย การใช้โมเลกุลหรือสารเสริมฤทธิ์ที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีขึ้น (Adjuvant) หรือแม้กระทั่งการกระตุ้นด้วยแอนติเจน 2 ชนิดร่วมกันเนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบที่มีสาเหตุจากเชื้อหลายชนิดแต่ก็พบข้อจำกัดในหลายด้าน ทั้งในด้านการพัฒนาเทคนิค การใช้โมเลกุลที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเสริมเข้าไปในดีเอ็นเอวัคซีนหรือใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งปัจจุบันการศึกษาวัดซีนดีเอ็นเอทั้งหมดยังจำกัดอยู่ในสัตว์ทดลอง ยังไม่มีการศึกษาในมนุษย์

โปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของมันฝรั่ง(Potato virus X coat protein, PVXCP) เป็นโปรตีนจากไวรัสเอ็กซ์จากมันฝรั่งซึ่งอยู่ในวงศ์ *Alphaflexiviridae* และเป็นสมาชิกในจีนัส *Potexvirus* เป็นอาร์เอ็นเอไวรัส ลักษณะเป็นเส้นใย ยืดหยุ่นได้ ยาวประมาณ 515 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 14.5 นาโนเมตร มีโปรตีนรูปแท่งเกาะประมาณ 1300 ซับยูนิตตลอดเส้นใย (Lico, Benvenuto, & Baschieri, 2015) ซึ่ง PVXCP ได้ถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็นโมเลกุลที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในวัคซีนป้องกันเนื้องอก สามารถช่วยกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีเฉพาะต่อต้านเนื้องอกผ่านทางโปรตีนบนผิวหน้าซีดี 4 ของเฮลเปอร์ทีเซลล์ (CD4 T cell) และ PVXCP ยังสามารถรวมตัวกันเพิ่มความเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการตอบสนองของ T cell อีกด้วย (Natalia Savelyeva et al., 2005; N. Savelyeva et al., 2001) และได้มีการนำ PVXCP ไปใช้ในการทดลองในมนุษย์ เฟสที่ 1 ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Meleshko et al., 2017) ทำให้ PVXCP มีความน่าสนใจในการนำมาเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันในวัคซีนป้องกัน ซึ่งยังไม่เคยมีการนำมาใช้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคมะเร็งในมนุษย์มาก่อน งานวิจัยนี้จึงมุ่งหวัง พัฒนาวัคซีนป้องกันด้านเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ PVXCP ร่วมด้วย

ดีเอ็นเอวัคซีนที่ใช้ในการทดลองนี้สร้างโดยใช้ ฟิมเบรีย เอ (FimA) เชื่อมกับโมเลกุลที่สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น คือ โปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของมันฝรั่ง(PVXCP) แล้วนำไปใส่ใน พลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid pcDNA3) ที่เป็นโครงสร้างหลัก โดย FimA หรือ FimA ที่เชื่อมต่อกับ PVXCP (FimA-PVXCP) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่เราสนใจ ถูกใส่เข้าไปในตำแหน่งระหว่าง HindIII และ XhoI ของพลาสมิดดีเอ็นเอ ดังภาพที่ 4 (Naaz & Kazim, 2018)



ภาพ 4 แสดงตำแหน่งต่างๆของพลาสมิดดีเอ็นเอ pcDNA3

โดยใช้เอนไซม์ในการตัดต่อแอนติเจนเข้ากับ พลาสมิดดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอไวรัสเข้าไปฉีดในสิ่งมีชีวิตโดยจุดมุ่งหมายคือการตอบสนอง ให้สร้างแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจง โดย CD4 มีบทบาทสำคัญในการช่วยลิโฟต์ไซตซ์ชนิดบี ในการผลิตแอนติบอดี เพิ่มจำนวนและควบคุมระบบป้องกันของภูมิคุ้มกันนี้ไว้ ทำให้ดีเอ็นเอไวรัสต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันป้องกันการทำลายตัวของกระดูกได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ในการทดลองนี้ใช้หนู BALB/c เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ เนื่องจากโตเต็มวัยแล้ว ใกล้เคียงกับวัยที่คนส่วนใหญ่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ฟันทุกซี่ขึ้นครบแล้ว และหนู BALB/c สามารถใช้ในการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน คุมปัจจัยทางพันธุกรรมได้ (Alam M, 2012) ตัวเล็ก สามารถจับและจัดการเวลาทำการทดลองได้ง่าย โดยซื้อจากบริษัทโนมูระสยาม โดยการทดลองแบ่งออกเป็น การทดลองหลักที่ทดสอบสมมติฐานงานวิจัย และการทดลองย่อยที่ทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนดีเอ็นเอ FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวิธีการหยดทางจมูก โดยในการทดลองหลักแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ดังนี้

1. กลุ่มทดลอง ได้แก่

1.1 หนูที่ได้รับวัคซีนที่ใช้ FimA เป็นแอนติเจนในพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 (pcDNA3.FimA หรือ FimA Vaccine) โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายเปรียบเทียบกัน 2 วิธี ได้แก่กลุ่มที่หยดวัคซีนทางจมูก (I.N.) และ กลุ่มที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยตรง (I.M.)

1.2 หนูที่ได้รับวัคซีนที่ใช้ FimA เป็นแอนติเจน เชื่อมกับโปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของ มันฝรั่ง (pcDNA3.FimA-PVXCP หรือ FimA-PVXCP vaccine) โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายเปรียบเทียบกัน 2 วิธี ได้แก่กลุ่มที่หยดวัคซีนทางจมูก (I.N.) และ กลุ่มที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยตรง (I.M.)

1.3 กลุ่มควบคุมลบ (Negative control) ของวัคซีน หนูได้รับวัคซีนที่มีโมเลกุลของ PVXCP เชื่อมกับแอนติเจนของมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด บีเซลล์ (B cell lymphoma) ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับแอนติบอดีต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส เนื่องจากไม่มีแอนติเจนของ FimA (pcDNA3.scFvBCL1-PVXCP หรือ BCL vaccine) โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายเปรียบเทียบกัน 2 วิธี ได้แก่กลุ่มที่หยดวัคซีนทางจมูก (I.N.) และ กลุ่มที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยตรง (I.M.) เช่นกัน

2. กลุ่มหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันใดๆ แล้วทำการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการสังเกตการละลายตัวของกระดุกแบ้าฟัน (*P.g.* challenge control)

3. กลุ่มของหนูที่ไม่ได้รับการกระทำใดๆ (No intervention) ถือเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) ของการทดลอง ใช้เปรียบเทียบผลระหว่างการได้รับและไม่ได้รับวัคซีน โดยแต่ละกลุ่มใช้จำนวนหนูทดลองตามที่สรุปไว้ในตารางที่ 4

ตาราง 4 แสดงจำนวนกลุ่มทดลองและจำนวนหนูที่ใช้ในการทดลอง

ช่องทางการให้วัคซีน	วัคซีนที่ได้รับ	จำนวน (ตัว)
กลุ่มที่ 1 กลุ่มทดลอง : ให้วัคซีนหยดทางจมูก (Intra nasal administration)	pcDNA3.FimA (FimA vaccine)	5
	pcDNA3.FimA-PVXCP (FimA-PVXCP vaccine)	5
	pcDNA3.scFvBCL1-PVXCP (BCL vaccine)	5
กลุ่มที่ 1 กลุ่มทดลอง : ให้วัคซีนโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular injection)	pcDNA3.FimA (FimA vaccine)	5
	pcDNA3.FimA-PVXCP (FimA-PVXCP vaccine)	5
	pcDNA3.scFvBCL1-PVXCP (BCL vaccine)	5
กลุ่มที่ 2 หนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ภูมิคุ้มกัน แล้วป้ายเชื้อพอร์ไฟโร โมแนส จิงจิवालิส (P.g. challenge control group)		3
กลุ่มที่ 3 กลุ่มของหนูที่ไม่ได้รับการ กระทำใดๆ (Negative group)		3
รวม		36

ต่อมาทำการแยกกลุ่มทดลองย่อยออกมาจากกลุ่มทดลองหลัก ในวันที่ 36 เนื่องจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกพบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส มีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ต่ำ ซึ่งทำให้กลุ่มทดลองหลัก เหลือหนูจำนวน 29 ตัว ดำเนินการทดลองตามโปรโตคอลปกติตามที่กล่าวต่อไป แต่ในส่วนของการทดลองย่อยที่แยกออกมา มีหนูจำนวน 7 ตัว ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองย่อยขึ้นเพื่อทดสอบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะในวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูก โดยนำหนู 2 ตัวจากกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการหยดทางจมูกแล้วร่วมกับหนูในกลุ่มควบคุมลบของการทดลองจำนวน 3 ตัวมาทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก โดยทำการหยดวัคซีน FimA-PVXCP ทางจมูกจำนวน 2 ครั้ง ดังนั้นหนู 2 ตัวจากกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ได้รับการหยดวัคซีนทั้งหมดรวม 4 ครั้ง และหนูที่เดิมเป็นกลุ่มควบคุมลบของการทดลองได้รับการหยดวัคซีนรวม 2 ครั้ง เป็นไปตามโปรโตคอลเดิมและให้ระยะเวลาในการสร้างภูมิคุ้มกันเป็นเวลา 1 เดือน นอกจากนี้ในกลุ่มการทดลองย่อยนี้ใช้หนูในกลุ่มวัคซีน FimA ที่หยดวัคซีนทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต์/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส จำนวน 2 ตัว เป็นกลุ่มที่ใช้เทียบเคียงเป็นกลุ่มควบคุมลบของการทดลอง ดังสรุปในตารางที่ 5

ตาราง 5 แสดงจำนวนกลุ่มทดลองและจำนวนหนูที่ใช้ในการทดลองย่อย

ช่องทางการให้วัคซีน	กลุ่มการทดลองเดิม	วัคซีนที่ได้รับในการทดลองย่อย	จำนวน (ตัว)
กลุ่มที่ 1 กลุ่มทดลอง : ให้วัคซีนหยดทางจมูก (Intra nasal administration)	กลุ่มวัคซีน FimA- PVXCP เคยได้รับการ กระตุ้นแล้วจำนวน 2 ครั้ง	pcDNA3.FimA-PVXCP (FimA-PVXCP vaccine) นำมากระตุ้นด้วยวัคซีนเดิม เพิ่มเติมอีกจำนวน 2 ครั้งและ ทิ้งช่วงระยะเวลานานกว่าการ ทดลองหลัก	2
	กลุ่มของหนูที่ไม่ได้รับ การกระทำใดๆ (Negative group)	pcDNA3.FimA-PVXCP (FimA-PVXCP vaccine) นำมากระตุ้นด้วยวัคซีน จำนวน 2 ครั้งเหมือนในการ ทดลองหลัก แต่มีช่วง ระยะเวลาพักที่นานกว่า	3
กลุ่มที่ 2 กลุ่ม เทียบเคียง เป็นกลุ่ม ควบคุมลบ	กลุ่มวัคซีน FimA ที่หยด วัคซีนทางจมูกที่มีค่า แอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/ มิลลิลิตร	ไม่ได้รับการให้วัคซีนเพิ่มเติม และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส	2
รวม			7

รายละเอียดของวัคซีนดีเอ็นเอและเชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

1. วัคซีนดีเอ็นเอ พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดย ดร. จันทรีภา จบศรี โดยใส่แอนติเจนที่สนใจเข้าไปที่ตำแหน่ง HindIII และ XhoI ในโครงสร้างหลักที่เป็น พลาสมิดดีเอ็นเอ 3 ผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการแล้วว่าสามารถผลิตแอนติเจนในเซลล์เอ็มบริโอนิกของไตมนุษย์ 293 (Human embryonic kidney , HEK293)ซึ่งเป็นเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian cell) ได้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) และเวสเทิร์น บล็อกติ่ง(Western blotting)โดยวัคซีนดีเอ็นเอที่ใช้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่
 - 1.1) วัคซีนที่ใช้ FimA เป็นแอนติเจนในพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 (pcDNA3.FimA หรือ FimA Vaccine)
 - 1.2) วัคซีนที่ใช้ FimA เป็นแอนติเจน เชื่อมกับโปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของมันเป็นฝรั่งในพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 (pcDNA3.FimA-PVXCP หรือ FimA-PVXCP vaccine) ซึ่งเป็นวัคซีนที่เราสนใจศึกษาว่าการที่ใส่โปรตีนห่อหุ้มไวรัส เอ็กซ์ของมันฝรั่งเข้าไปนั้น มีประสิทธิภาพในการช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้นหรือไม่
 - 1.3) วัคซีนที่ใส่แอนติเจนของ B cell lymphoma เข้าไปในพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 (pcDNA3.scFvBCL1-PVXCP หรือ BCL vaccine) คล้ายกับการผลิตวัคซีนดีเอ็นเอในการศึกษาของ Savelyeva และคณะ จัดเป็นกลุ่ม Negative control ของวัคซีน (N. Savelyeva, Zhu, & Stevenson, 2003) สามารถสรุปเป็นแผนภาพได้ดังภาพที่ 5



ภาพ 5 แสดงวัคซีนดีเอ็นเอแต่ละแบบในพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 ที่ใช้ในการทดลอง

2. เชื้อฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC® 33277™

2. ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

ตัวแปรต้น คือ ดีเอ็นเอวัคซีน ได้แก่ FimA vaccine และ FimA-PVXCP vaccine

ตัวแปรตาม คือ การตอบสนองของแอนติบอดี และการเปลี่ยนแปลงของกระดูก

ตัวแปรควบคุม คือ สายพันธุ์, เพศ และอายุของหนู

สเตรนของเชื้อ *P. gingivalis* ATCC® 33277™

ปริมาณการป้ายเชื้อ *P. gingivalis*

ปริมาณของวัคซีนดีเอ็นเอที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3. เครื่องมือและการพัฒนาเครื่องมือ

1) เครื่อง Microplate photometer หรือ ELISA reader (xMark™, Bio rad)

และโปรแกรมซอฟต์แวร์ MPM

2) เครื่อง Micro CT scanner (Skyscan 1173, Bruker) และ Micro CT Software

(สร้างเป็นภาพ 3 มิติด้วยโปรแกรม DATAVIEWER, วิเคราะห์ภาพ 3 มิติด้วย

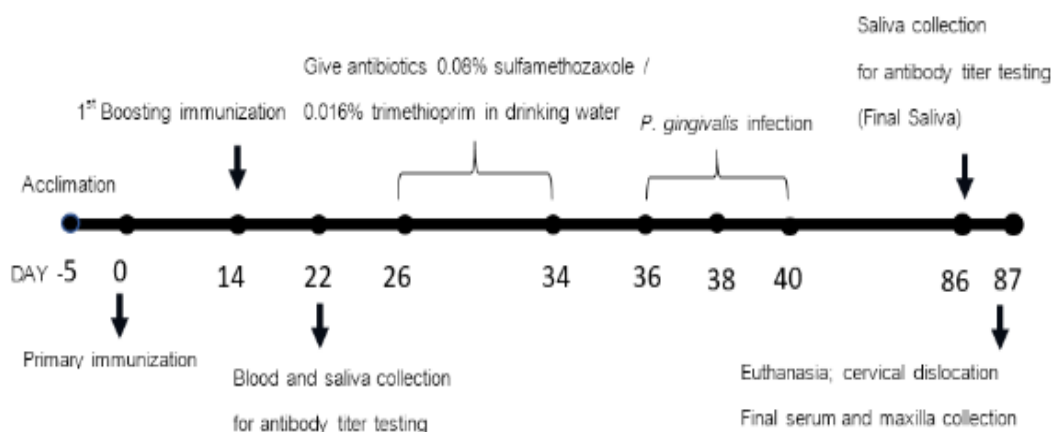
โปรแกรม CTAN)

3) Anaerobic cabinet station (รุ่น 1029, Thermo Scientific)

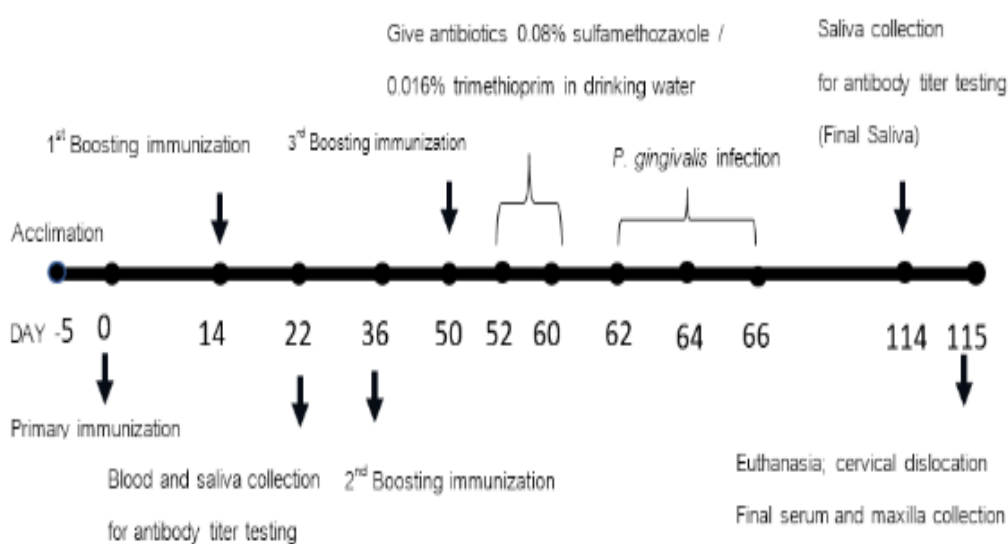
4) ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ ชนิดที่ 2 (รุ่น 3440831, Labconco™)

4. การเก็บรวบรวมข้อมูล

ภาพรวมระยะเวลาในการศึกษาทดลองในหนู ตัดแปลงมาจากโปรโตคอลในการศึกษาของ Yu และคณะสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 6 และ 7



ภาพ 6 แสดงระยะเวลาในการศึกษาหนูทดลองในห้องปฏิบัติการของการทดลองหลัก



ภาพ 7 แสดงระยะเวลาในการศึกษาหนูทดลองในห้องปฏิบัติการของการทดลองย่อย

ขั้นตอนในการทดลอง แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง

ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกโดยนำพลาสมิดวัคซีนดีเอ็นเอ (Plasmid DNA vaccine) มากระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับหนู แต่ละกลุ่มตามที่ระบุไว้ นับเป็นวันที่ศูนย์ ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 2 แบบ คือ วิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้อและหยดวัคซีนทางจมูก

วิธีฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อ ทำได้โดยมีคณจับหนูไว้กับตะแกรงของกรงให้นิ่ง ผู้ฉีดดึงขาข้างที่ต้องการฉีดออกมา ใช้ 70% แอลกอฮอล์เช็ดบริเวณกล้ามเนื้อควอดริเซ็ป (Quadriceps muscle) เพื่อทำความสะอาดบริเวณที่ต้องการฉีดและเห็นแนวกล้ามเนื้อชัดเจน จากนั้นฉีดวัคซีนด้วยเข็มเบอร์ 27 ทำมุม 60 องศาหรือตั้งฉากกับกล้ามเนื้อ ทำการดึงเข็มกลับเล็กน้อยเพื่อความมั่นใจว่าไม่เข้าเส้นเลือดแล้วจึงฉีดดีเอ็นเอวัคซีนจำนวน 50 ไมโครกรัม ผสมในน้ำเกลือฆ่าเชื้อ (Sterile saline) 50 ไมโครลิตร เข้าสู่กล้ามเนื้อ (Hirota & Shimizu, 2012) ดังภาพที่ 8 (Shimizu, 2012)



ภาพ 8 แสดงตำแหน่งและวิธีการฉีดวัคซีนเข้าสู่กล้ามเนื้อ

วิธีการหยดวัคซีนทำได้โดยมีคณจับหนูไว้ในท่าที่ยกศีรษะขึ้น จากนั้นค่อยๆ หยดวัคซีนดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ในยาชา 0.25 % บิวพิวาเคน ไฮโดรคลอไรด์ (Bupivacaine hydrochloride) ทางจมูกด้วยไมโครปิเปตในปริมาณ 10 ไมโครลิตรอย่างระมัดระวัง (Yu et al., 2011) ดังภาพที่ 9 (Shimizu, 2012)



ภาพ 9 แสดงวิธีการหยดวัคซีนในหนูทดลอง

ทำการฉีดและหยดวัคซีนกระตุ้นอีกครั้งในวันที่ 14 เป็นการกระตุ้นซ้ำจำนวน 1 ครั้ง ด้วยวัคซีนเดิมที่แบ่งไว้ในแต่ละกลุ่ม หลังจากนั้น 7 วัน การเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำลายไปทำการทดสอบวิเคราะห์ผลแอนติบอดี

2. การกระตุ้นให้ติดเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส

ก่อนการปายเชื้อเพื่อกระตุ้นให้มีการติดเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส มีการเริ่มให้ยาปฏิชีวนะซัลฟาเมทอกซาโซล 0.08% (Sulfamethoxazole) ไตรเมโทพริม 0.016% (Trimethioprim) ในน้ำดื่มเป็นเวลา 10 วัน เพื่อเป็นการเตรียมช่องปาก กำจัดเชื้อก่อโรคอื่นๆ ก่อนทำการกระตุ้นให้ติดเชื้อด้วยเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส จากนั้นทิ้งระยะให้หนูปลอดจากยาปฏิชีวนะเป็นเวลา 3 วัน แล้ววันที่ 36 จึงเริ่มทำการปายเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส (ATCC® 33277™) ให้แก่หนูทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทดลองที่ได้รับวัคซีนประเภทต่างๆ และกลุ่ม *P.g.* challenge control ด้วยวิธีการทางช่องปาก (Oral gavage) วันละครั้ง และทิ้งระยะพัก 1 วัน จำนวน 3 ครั้ง โดยวิธีการคือนำเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาปั่นตกตะกอน ดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกใส่ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลิน (Phosphate-buffered saline, PBS) เข้าไปแล้ว นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นยาว 600 นาโนเมตร เพื่อเช็คปริมาณของเชื้อให้ได้ 10^9 โคโลนีที่รวมตัวเป็นยูนิต (Colony forming unit, CFU) โดยเทียบกับความขุ่นมาตรฐานแม็กฟาแลน (McFarland standard) ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงประมาณ 0.669 นำเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลิน (Phosphate buffered saline PBS) ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร ผสมสารซี เอ็ม ซี (Carboxymethylcellulose, CMC) ที่เป็นสารทำให้ข้นเหนียวซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในเฟลทแก้วให้เข้ากัน มีลักษณะเหนียวข้นมากขึ้น ดูดเชื้อที่เตรียมได้ข้นเหนียวด้วยกระบอกฉีดยา

นำไปป้ายในช่องปากหนู ตัวละ 100 ไมโครลิตร ให้โดนฟันทุกซี่ ผ่านทางเข็มให้อาหารเบอร์ 20 ยาว 1 ถึง 1.5 นิ้ว

3. การวิเคราะห์แอนติบอดี

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำลาย ในวันที่ 22 และ 87 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อ FimA ในขั้นตอนการเก็บเลือดนั้นทำโดยการตัดปลายหาง ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เก็บเลือดประมาณ 0.2 มิลลิตรด้วยหลอดไมโครเซนติพิวก์ แต่ในครั้งสุดท้ายที่เก็บเลือด ทำการดูดเลือดจากหัวใจ ประมาณ 1 มิลลิตรด้วยไซริงค์ ส่วนการเก็บน้ำลายทำได้โดยใช้วิธีการฉีดยาพิโลคาร์ปิน (Pilocarpine) ขนาดยา 5 มก/กก ในน้ำสะอาดเข้าช่องท้อง รอ 2-3 นาที ยามีผลกระตุ้นให้สารถ คัดหลังไหลออกมา ทำการเก็บน้ำลายด้วยกระบอกฉีดยาให้ได้ประมาณ 0.2 มิลลิตร

นำเลือดที่ได้มาปั่นแยกเก็บส่วนซีรัมสำหรับการตรวจสอบแอนติบอดีจำเพาะต่อ FimA (Anti-FimA antibodies) เพื่อวิเคราะห์หาแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อ FimA ของเชื้อพอร์ไฟโรโมนแนสจิงจิवालิสต์ด้วยวิธีการอินไดเรกต์เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (Indirect ELISA) โดยการนำ FimA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 100 ไมโครลิตรใช้เป็นแอนติเจนเคลือบพื้นผิวของหลุมในเพลททดลองขนาด 96 หลุม ทิ้งไว้ 1 คืน ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างออกด้วยสารละลายน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ผสมทวิน-20 (PBST) หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 รอบ จากนั้นบล็อกด้วยสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน 0.5% (BSA) ใน PBS 100 ไมโครลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 รอบ จากนั้นใส่ซีรัมที่ต้องการทดสอบการมีแอนติบอดีลงไป โดยมีการเจือจางเป็นลำดับ (Serial dilution) 4 เท่า เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1:20 จำนวน 4 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละเพลทมีการใส่สารสำหรับเป็นกลุ่มควบคุมบวก ที่เจือจางเป็นลำดับ 2 เท่า เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1:300 จำนวน 8 หลุม ซ้ำ 2 แถว รวม 16 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร และกลุ่มควบคุมลบ เจือจางเป็นลำดับ (Serial dilution) 4 เท่า เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1:20 จำนวน 4 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตรอยู่ในเพลท ทิ้งไว้ 90 นาทีอุณหภูมิห้อง ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 รอบ เติมน้ำแอนติบอดีที่จำเพาะได้แก่ Anti-mouse IgG หรือ Anti-mouse IgA ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สเรดิช เพอร์ออกไซด์ (Horseradish peroxidase) สำหรับการตรวจหา anti-FimA IgG ในเลือด หรือ anti-FimA IgA ในน้ำลายความเข้มข้น 1: 1,000 ใน PBST 100 ไมโครลิตรลงในหลุมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจับกันกับแอนติบอดีที่สนใจนาน 1.5 ชั่วโมง ทำการล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 3 รอบ จากนั้นเติมน้ำสารซับสเตรท O-phenylenediamine substrate (Thermo Fisher Scientific®) 5 มิลลิกรัมในน้ำที่ผ่านการแยก

ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำการเติมสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Stable peroxidase substrate buffer, Thermo Fisher Scientific®) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรละลายจนเข้ากัน จึงนำไปใส่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 45 นาทีให้เอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับซัสเตรทถูกออกซิไดส์ด้วย ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จนเกิดการเปลี่ยนสีตามปริมาณเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนติบอดีที่ ศึกษา จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร ซึ่งถูกบันทึกด้วยซอฟต์แวร์ไมโครเพลต แมเนเจอร์ (Microplate manager®) ได้เป็นค่า ความเข้มข้นของแอนติบอดี หน่วยยูนิต์ต่อมิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟัน

วันที่ 87 ทำการการุณยฆาตหลังจากวางยาสลบคีตามีน (Ketamine) ขนาดยา 80-100 มก/กก และ ซิลลาซีน (Xylazine) 10-12.5 มก/กก ฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อสลบทำการ การุณยฆาตด้วยการดึงคอ (Cervical dislocation) เก็บเลือดจากหัวใจ จากนั้นตัดหัวแบ่งครึ่ง ขากรรไกรบน (Hemi maxilla) ตามแนวกะโหลกศีรษะ (Suture) ด้วยมีดผ่าตัดเบอร์ 15 หรือ 11 แล้วนำครึ่งซ้ายแช่ 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ (Paraformaldehyde) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อ เก็บตัวอย่างไว้สำหรับการวิจัยในอนาคต ครึ่งขวาแช่ 10% นิวทรัล บัฟเฟอร์ ฟอร์มาลิน (Neutral buffered formalin) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนมาใส่ PBS เพื่อรอไปถ่ายภาพรังสีวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูก ด้วยเครื่อง Micro-CT รุ่น Skyscan 1173 ของ Bruker ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำ Maxilla วางบนเพลท พลาสติกขนาดพอดีตัวอย่างแล้วปิดฝาเข้าไปวางที่แท่นสแกนให้ในแนว Saggital plane ของตัวอย่าง ขนานกับลำรังสี ตั้งค่าพารามิเตอร์ในการสแกน โดยใช้ค่าความต่างศักย์หลอดเป็น 70 กิโลโวลต์ ค่ากระแสหลอดเวลาเป็น 114 ไมโครแอมแปร์ และความหนา 0.0081 มิลลิเมตร ต่อสไลด์ (Voxel size 8.1 μm) เมื่อเครื่องสแกนและประมวลผลเสร็จแล้ว จึงใช้โปรแกรมดาต้าวิวเวอร์ (Data viewer) และซีทีเอนท์ (CTant) ในการวิเคราะห์ผลในขั้นตอนการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกจาก ภาพถ่ายรังสีสามมิติ ทำการศึกษาวิเคราะห์ผลออกมาเป็น 4 พารามิเตอร์ ได้แก่ ปริมาตรของกระดูกที่ หลงเหลืออยู่ โดยคิดเป็นร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Percent bone volume/Total volume) ความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density) ระยะที่ เปลี่ยนแปลงไปของกระดูก และร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss)

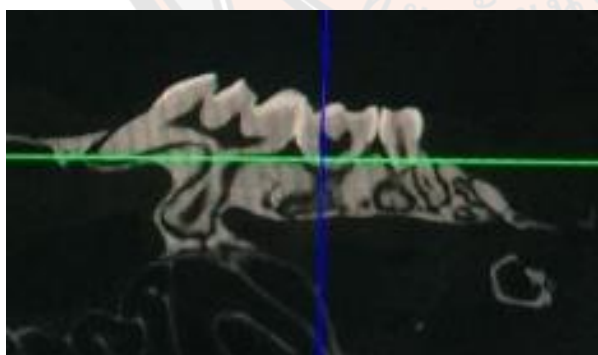
ขั้นตอนการหาปริมาตรของกระดูก

เริ่มต้นโดยการเลือกบริเวณที่สนใจ (Field of interest, FOI) ซึ่งได้แก่บริเวณฟันกรามหลังบนของหนูทดลองในโปรแกรม Data viewer โดยใช้เกณฑ์ในการตั้งระนาบต่างๆ ดังนี้

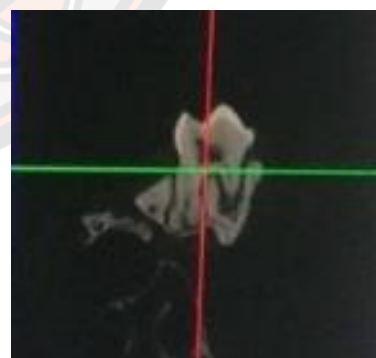
- 1) ระนาบที่แบ่งส่วนหน้าและส่วนหลัง (Coronal plane) คือเลือกให้ระนาบอยู่ตรงกลางระหว่างความหนากระดูกทางด้านแก้มและเพดานปาก (Buccopalatal width) ของฟันซี่ M2
- 2) ระนาบที่แบ่งซ้ายและขวา (Sagittal plane) เลือกให้ระนาบอยู่ตรงกึ่งกลางฟันซี่ M2
- 3) ระนาบที่แบ่งบนและล่าง (Transverse plane) ปรับให้ตัวอย่างตั้งฉากกับพื้น ดังภาพที่ 10



Coronal plane



Sagittal plane



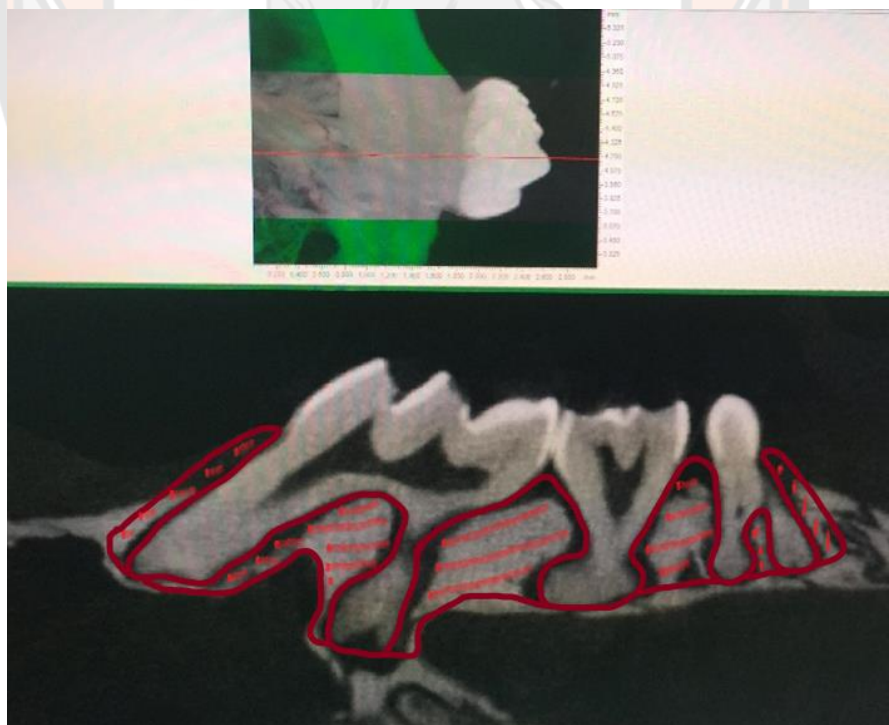
Transverse plane

ภาพ 10 แสดงระนาบต่างๆ ในการเลือกบริเวณที่สนใจใช้ในการวิเคราะห์ผล

เมื่อได้ระนาบที่ต้องการทำการบันทึกชุดข้อมูลไปเปิดในโปรแกรม CTant เพื่อเลือกขอบเขตบริเวณที่สนใจต้องการนำไปวิเคราะห์ (Region of interest, ROI) โดยมีขอบเขตบริเวณกระดูกที่สนใจดังนี้

- 1) ขอบเขตทางด้านใกล้กลาง ลากเส้นขนานรากฟันทางด้านใกล้กลางของฟันกรามซี่ M1 ประมาณ 2 มิลลิเมตร
- 2) ขอบเขตทางด้านใกล้กลาง ลากเส้นขนานรากฟันทางด้านใกล้กลางของฟันกรามซี่ M3 ประมาณ 2 มิลลิเมตร
- 3) ขอบเขตทางด้านล่าง ลากเส้นต่อเนื่องที่ระดับปลายรากฟันในทุกๆซี่
- 4) ขอบเขตทางด้านบน คือ บริเวณสูงสุดของง่ามรากฟัน และรอยต่อระหว่างเคลือบรากฟันและรากฟัน

ทำการลากเชื่อมขอบเขตทั้งสี่ด้านให้ต่อเนื่องกัน ไม่รวมเอาบริเวณเนื้อฟันหรือรากฟัน ดังภาพที่ 11 เลือกขอบเขตบริเวณที่สนใจแบบนี้ไปเรื่อยในทุกๆ 5 สไลด์ โดยกำหนดขอบเขตที่เริ่มวิเคราะห์สไลด์แรกและสไลด์สุดท้ายคือเมื่อเห็นรากฟันหรือตัวฟันปรากฏในสไลด์



ภาพ 11 แสดงถึงขอบเขตบริเวณที่สนใจต้องการวิเคราะห์ (Region of interest, ROI) ในการหาปริมาตรของกระดูก

เมื่อเลือกขอบเขตบริเวณที่สนใจได้แล้ว สามารถอ่านและแปลผลข้อมูลในซอฟต์แวร์ของเครื่อง Micro-CT ได้ออกมาในพารามิเตอร์ของ ปริมาตร คือ ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อ ปริมาตรทั้งหมด(Bone volume/Total volume, BV/TV) เพื่อประเมินการทำลายของกระดูก รองรับฟัน (Zhang, Ju, Rigney, & Tribble, 2014)

ขั้นตอนการหาความหนาแน่นของกระดูก

บริเวณที่สนใจ (Field of interest, FOI) ใช้บริเวณเดียวกันกับขั้นตอนการหาปริมาตรของ กระดูกที่ได้บันทึกชุดข้อมูลไว้ ดังภาพที่ 10 มาเปิดในโปรแกรม CTant เพื่อเลือกขอบเขตบริเวณที่ สนใจต้องการนำไปวิเคราะห์ (Region of interest, ROI) โดยมีขอบเขตบริเวณกระดูกที่สนใจดังนี้

- 1) ขอบเขตทางด้านใกล้กลาง ลากเส้นขนานขีดรากฟันทางด้านใกล้กลางของฟันกรามซี่ M1 ครึ่งความยาวรากฟัน
- 2) ขอบเขตทางด้านใกล้กลาง ลากเส้นขนานขีดรากฟันทางด้านใกล้กลางของฟันกรามซี่ M2 ครึ่งความยาวรากฟัน
- 3) ขอบเขตทางด้านล่าง ลากเส้นต่อเนื่องที่ระดับครึ่งความยาวรากฟัน
- 4) ขอบเขตทางด้านบน คือ รอยต่อระหว่างเคลือบรากฟันและรากฟันของฟันกรามซี่ M1 และ M2

ทำการลากเชื่อมขอบเขตทั้งสี่ด้านให้ต่อเนื่องกัน ไม่รวมเอาบริเวณเนื้อฟันหรือรากฟัน ดังภาพที่ 12 เลือกขอบเขตบริเวณที่สนใจแบบนี้ไปเรื่อยในทุกๆ 5 สไลด์ โดยกำหนดขอบเขตที่เริ่มวิเคราะห์สไลด์ แรกและสไลด์สุดท้ายคือเมื่อเห็นรากฟันหรือตัวฟันปรากฏในสไลด์

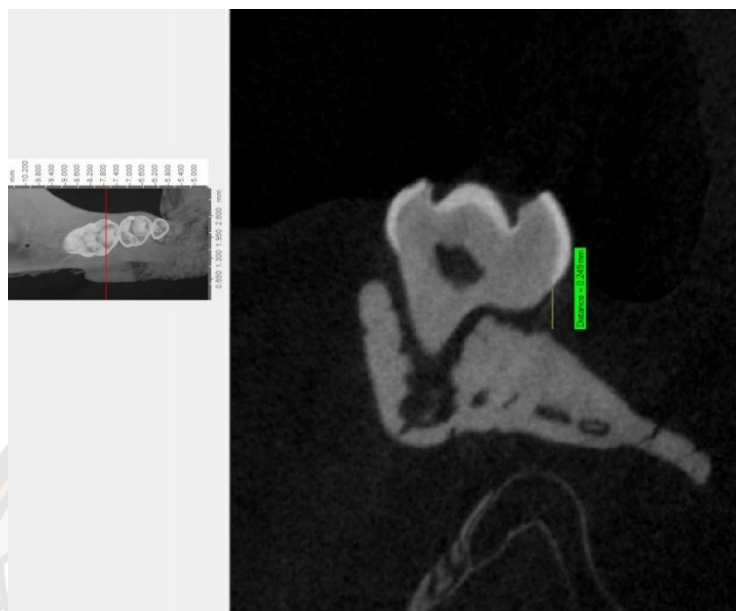


ภาพ 12 แสดงถึงขอบเขตบริเวณที่สนใจต้องการวิเคราะห์ (Region of interest, ROI)
ในการหาความหนาแน่นของกระดูก

เมื่อเลือกขอบเขตบริเวณที่สนใจได้แล้ว สามารถอ่านและแปลผลข้อมูลในซอฟต์แวร์ของเครื่อง Micro-CT ได้ออกมาในพารามิเตอร์ของความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD) เพื่อประเมินการทำลายของกระดูกรองรับฟัน

ขั้นตอนการหาระยะที่เปลี่ยนแปลงไปของกระดูก

ในส่วนของพารามิเตอร์นี้ วัดได้จากระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟันเทียบกับตำแหน่งรอยต่อเคลือบรากฟันและรากฟัน ทำการวัดใน 6 ตำแหน่งต่อซี่ฟัน คือ บริเวณเส้นมุมด้านไกลกลาง กึ่งกลางซี่ฟัน และบริเวณเส้นมุมด้านใกล้กลางของทั้งด้านแก้มและด้านลิ้น รวม 6 ตำแหน่ง หน่วยเป็นมิลลิเมตร และวัดทุกซี่ฟัน ทั้ง ซี่ M1, M2, M3 วัดจำนวน 3 ครั้งในตำแหน่งเดิมแล้วนำค่ามาเฉลี่ยกันโดยทำการเลือกวัดในตำแหน่งใกล้กลาง กึ่งกลาง ไกลกลางของฟันที่กำหนดให้มากที่สุด ดังภาพที่ 13



ภาพ 13 แสดงตำแหน่งการวัดระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูก

ขั้นตอนการหาร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss)

ในพารามิเตอร์สุดท้ายนี้ สามารถหาค่าได้จากการวัดใน Sagittal plane โดยเลือก section ที่อยู่กึ่งกลางและเห็นความยาวของรากฟันเฉลี่ยทั้ง 3 ซี่มากที่สุด ทำการวัดความยาวรากฟันโดยวัดจากระยะรอยต่อเคลือบผิวฟันกับเคลือบรากฟัน (CEJ) ถึงปลายรากฟัน และวัดระดับของกระดูกที่เหลืออยู่โดยวัดจากยอดบนสุดของกระดูกเข้าฟันไปถึงปลายรากฟัน โดยวัดที่ตำแหน่งใกล้กลางและใกล้กลางของฟันทั้ง 3 ซี่ รวม 6 ตำแหน่ง ทำการวัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาคิดเป็นร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟัน

สามารถสรุปขั้นตอนการทดลองในหนูตลอดการทดลองที่กล่าวไปตามตารางที่ 6 ดังนี้

ตาราง 6 แสดงขั้นตอนการทดลองทั้งหมดในหนูทดลอง

ขั้นตอน	การจับยึด	การระงับ	วัสดุอื่นๆ
	ความรู้สึก		
พักสัตว์	-	-	-
กระตุ้นภูมิครั้งแรก	จับยึดปกติในท่า	-	ไมโครปิเปต, ดีเอ็นเอวัคซีน 5
- วิธีหยดวัคซีนทาง	นอนพร้อมยกศีรษะ		ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ในยาชา
จมูก	ขึ้นเล็กน้อย		0.25% Bupivacaine ปริมาณ
			10 ไมโครลิตร
- การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ	จับตรึงไว้กับ	-	70% แอลกอฮอล์, เข็ม เบอร์
	ตะแกรงของกรง		27 ยาว 0.5 นิ้ว , ดีเอ็นเอวัคซีน
	หรืออุปกรณ์จับ		50 ไมโครกรัม ในน้ำปราศจาก
	บั้งคับ		เชื้อ 50 ไมโครลิตร
ให้ยาปฏิชีวนะเป็น	-	-	0.08% ซัลฟาเมทอกซาโซล
เวลา 10 วัน			/0.016% ไตรเมโทพริม ในน้ำ
			ดื่ม
กระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำ	จับยึดปกติในท่า	-	ไมโครปิเปต, ดีเอ็นเอวัคซีน 5
ครั้งที่ 1	นอนพร้อมยกศีรษะ		ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ในยาชา
- วิธีหยดวัคซีนทาง	ขึ้นเล็กน้อย		0.25% Bupivacaine ปริมาณ
จมูก			10 ไมโครลิตร
- การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ	จับตรึงไว้กับ	-	70% แอลกอฮอล์, เข็ม เบอร์
	ตะแกรงของกรง		27 ยาว 0.5 นิ้ว , ดีเอ็นเอวัคซีน
	หรืออุปกรณ์จับ		50 ไมโครกรัม ในน้ำปราศจาก
	บั้งคับ		เชื้อ 50 ไมโครลิตร

ขั้นตอน	การจับยึด	การระงับ	วัสดุอื่นๆ
ความรู้สึกร			
หยุดการให้ยา	-	-	-
ปฏิชีวนะ			
เก็บเลือดสำหรับ	อุปกรณ์จับบังคับ	ยาชา 2%	70% แอลกอฮอล์ ,
ตรวจสอบ	หนูเมาส์	ไซโลเคนเจล	ไบมิตเบอร์ 15 ,
แอนติบอดี; ตัดปลาย			หลอดแอฟเฟนดอร์ฟ
หาง (0.2 มิลลิลิตร)			
เก็บน้ำลาย	จับบังคับหนูเมาส์	-	ฉีดยา ฟิโลคาร์พิน 5 มก/กก ในน้ำ
(0.2 มิลลิลิตร)	ด้วยสองมือ หรือ		ที่ฆ่าเชื้อทางช่องท้องด้วยเข็ม
	จับบังคับโดยผู้ช่วย		เบอร์ 27 ใช้กระบอกฉีดยาดูด
			น้ำลาย
ป้ายเชื้อ <i>P. gingivalis</i>	จับบังคับหนูเมาส์	-	ป้ายเชื้อ <i>P. gingivalis</i> 10 ⁹
	ด้วยสองมือ หรือ		CFU ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
	จับบังคับโดยผู้ช่วย		ที่ผสม PBS และ 2% CMC,
			เข็มให้อาหาร
การฉีดยาและเก็บ	-	คีตาซีน 80-	เข็มเบอร์ 27 ยาว 0.5 นิ้ว ,
เลือดครั้งสุดท้าย		100 mg/kg ,	70%แอลกอฮอล์, เข็มเบอร์ 25
สำหรับตรวจสอบ		ไซลาซีน 10-	ยาว 1 นิ้ว สำหรับเก็บเลือดจาก
แอนติบอดี; จากหัวใจ		12.5mg/kg	หัวใจ
(1 มิลลิลิตร)		ฉีดเข้าช่อง	
		ท้อง	

ขั้นตอน	การจับยัด	การระงับ	วัสดุอื่นๆ
ความรู้สึกร			
ทำการเก็บกระดูก ขากรรไกรบน	-	-	กรรไกร , ใบมีดเบอร์ 15 , 4% paraformaldehyde, 10% neutral buffered formalin สำหรับ เก็บกระดูกขากรรไกรบน

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง วิเคราะห์โดยใช้ค่ามัธยฐานของปริมาณแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลลิส ที่เกิดขึ้นในกระแสเลือดและน้ำลาย ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ เปรียบเทียบปริมาณแอนติบอดีจำเพาะที่เกิดขึ้นระหว่างกลุ่มว่ามีความแตกต่างกันอย่างไรในแต่ละช่วงเวลา ข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติใช้การทดสอบของครัสคาลและวัลลิส (Kruskal-Wallis Test) ทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่ด้วยการทดสอบแมน วิทนี ยู (Mann-Whitney U test) กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 8.2.0

การวิเคราะห์ผลการป้องกันการละลายตัวของกระดูก ทำโดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของกระดูกด้วยเครื่อง Micro-CT โดยใช้ ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Bone volume/Total volume, BV/TV), ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD), ค่าเฉลี่ยระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟันกับรอยต่อเคลือบรากฟันและรากฟัน เพื่อประเมินการทำลายของกระดูกรองรับฟัน โดยแต่ละพารามิเตอร์ ถูกนำข้อมูลมาเทียบกับกลุ่มควบคุมและ *P. gingivalis* challenge control ข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติใช้ Kruskal-Wallis Test ทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่ด้วยวิธี Mann-Whitney U test กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 8.2.0 เช่นเดียวกัน

บทที่ 4

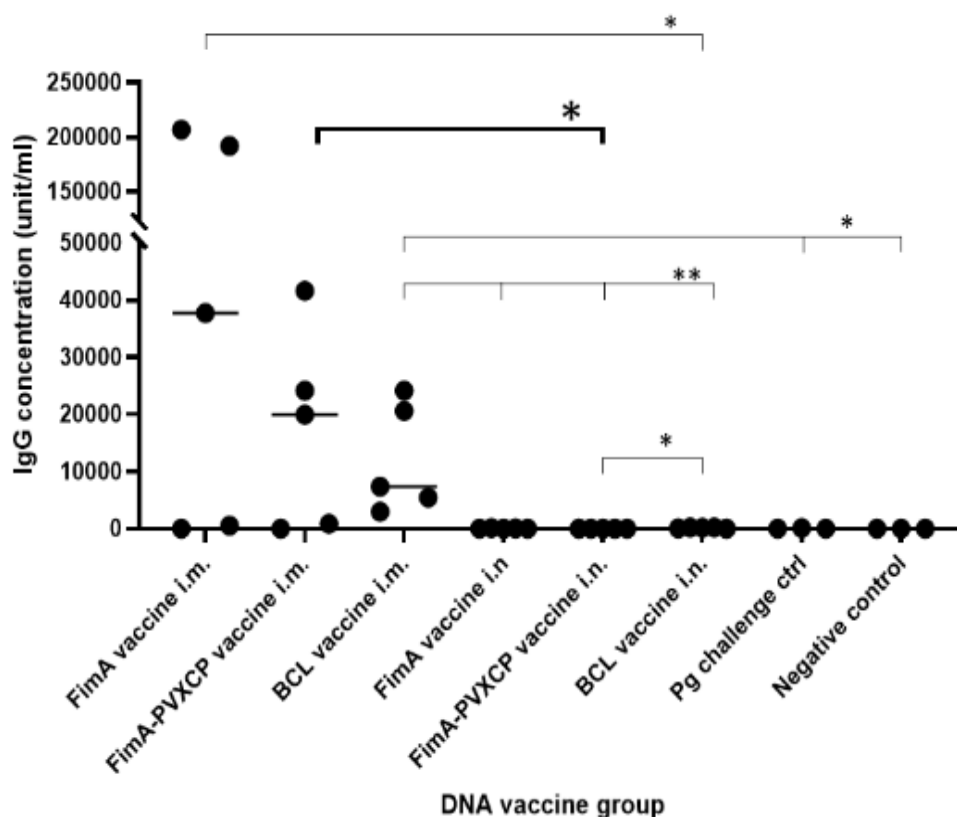
ผลการวิจัย

การศึกษานี้ทำเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนดีเอ็นเอต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส (FimA-PVXCP vaccine) ในการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส และความสามารถในการป้องกันการละลายตัวของกระดูก โดยในการทดลองนี้ทำการเปรียบเทียบชนิดของวัคซีน 3 ชนิด และทดสอบเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมแก่วัคซีนดีเอ็นเอต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยเลือกวิธีหยดทางจมูกเปรียบเทียบกับวิธีการฉีดทางกล้ามเนื้อ ในการทดลองครั้งนี้

ผลการวิเคราะห์หาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฟิมเบรีย เอ ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสด้วยวิธีการอินไดเรคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (Indirect ELISA)

1. การสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี จำเพาะในซีรัม (IgG)

ภายหลังจากทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองครบสองครั้งในหนูทดลองตามกลุ่มที่ได้แบ่งไว้ รอระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์หลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยในวันที่ 22 หนูทดลองจำนวน 36 ตัวมีการตอบสนองปกติไม่มีอาการป่วยหรือเสียชีวิตตลอดการทดลอง เมื่อนำซีรัมที่เก็บจากหนูทดลองในแต่ละกลุ่มมาตรวจหาแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ที่จำเพาะต่อฟิมเบรีย เอ ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสพบปริมาณแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลินจีจำเพาะ ในแต่ละกลุ่มได้ดังภาพที่



ภาพ 14 แสดงค่ามัธยฐานปริมาณแอนติบอดี IgG จำเพาะในซีรัม ภายหลังจากการกระตุ้น ภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 22 (หน่วย/มิลลิลิตร)

FimA vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน *FimA* ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, *FimA-PVXCP vaccine i.m.* หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอ วัคซีน *FimA-PVXCP* ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, *BCL vaccine i.m.* หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอ วัคซีน *BCL* ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ *FimA vaccine i.n.* หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอ วัคซีน *FimA* ด้วยการหยดทางจมูก, *FimA-PVXCP vaccine i.n.* หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วย ดีเอ็นเอวัคซีน *FimA-PVXCP* ด้วยการหยดทางจมูก, *BCL vaccine i.n.* หมายถึงกลุ่มที่ กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน *BCL* ด้วยการหยดทางจมูก, *P.g. challenge control* หมายถึง กลุ่มที่ไม่ได้มีการให้วัคซีนใดๆ แต่ป่วยเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลลิส, กลุ่ม *Negative control* คือกลุ่มควบคุมลบ (* คือ $p < 0.05$, ** คือ $p < 0.01$ เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test)

เมื่อมองภาพรวมของผลการทดลองจะเห็นว่าเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพ มากกว่าคือ การฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูก โดยพบว่า วัคซีน *FimA-PVXCP* ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมอยู่ในช่วง 0 – 41,640.81 หน่วย/มิลลิลิตร ในขณะที่การหยดวัคซีน *FimA-PVXCP* ทาง

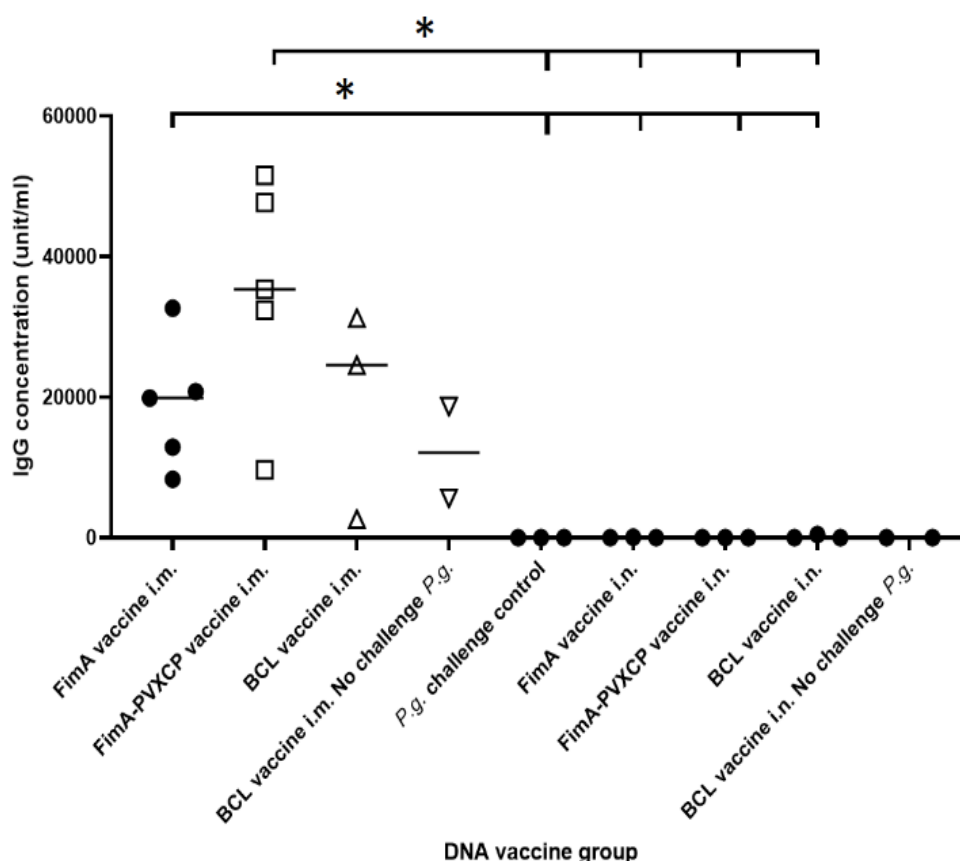
จุ่มไม่พบการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัม กล่าวคือตรวจพบแอนติบอดีจำเพาะ 0 ยูนิต/มิลลิลิตร คล้ายคลึงกับวัคซีน FimA ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมอยู่ในช่วง 0 – 206,951.3 ยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่การหยดวัคซีน FimA ทางจมูก พบมีการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมเพียงเล็กน้อย 0-109.5 ยูนิต/มิลลิลิตร และวัคซีน BCL ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อพบการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัม 2,973.26 – 24,200.61 ยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่วัคซีน BCL ที่หยดทางจมูกพบมีการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมเล็กน้อยอยู่ในช่วง 0-229.21 ยูนิต/มิลลิลิตร จะเห็นว่าเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมได้มากกว่า ในระยะเวลาที่เท่ากัน

จะเห็นว่าในเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในวัคซีนแต่ละชนิด โดยพบว่าวัคซีน FimA-PVXCP วัคซีน FimA และวัคซีน BCL สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) โดยพบค่าไตเตอร์มัธยฐานของแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม 19,973, 37,742.22 และ 7,396.09 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เทคนิคการ กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูก วัคซีน FimA-PVXCP มีการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม น้อยกว่าโดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับวัคซีน BCL โดยมีค่ามัธยฐานของปริมาณแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัม 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 164.73 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่วัคซีน FimA มีค่ามัธยฐานของปริมาณแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัม 0 ยูนิต/มิลลิลิตร เช่นกัน

หากพิจารณาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ต่อฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส ที่เกิดขึ้นพบว่ากลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยเทคนิคการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าไตเตอร์มัธยฐานของแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) มากกว่าการที่กระตุ้นด้วยการหยดทางจมูกด้วยวัคซีนชนิดเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่ามัธยฐานของปริมาณแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมมีค่า 19,973 ยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่เทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีน FimA-PVXCP พบแอนติบอดีจำเพาะ 0 ยูนิต/มิลลิลิตร ส่วนวัคซีน FimA และ BCL มีปริมาณแอนติบอดีแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัม มากกว่าการหยดวัคซีนทางจมูกเมื่อเทียบในวัคซีนชนิดเดียวกันดังที่กล่าวไปแต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

เนื่องจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกพบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ต่ำ จึงทำการแบ่งกลุ่มการทดลองย่อยขึ้นเพื่อทดสอบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะในวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูก โดยนำหนู 2 ตัวจากกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการหยดทางจมูกแล้วร่วมกับหนูในกลุ่มควบคุมมาทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูกเพิ่มเติมจำนวน 3 ตัว โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่หยดทางจมูกเดิมอยู่แล้วกระตุ้นเพิ่มจำนวน 2 ครั้ง รวมทั้งหมด 4 ครั้ง ในขณะที่กลุ่มควบคุมเดิมนำมากระตุ้นใหม่ด้วยวัคซีน FimA-PVXCP ใหม่กระตุ้นด้วยการหยดทางจมูก จำนวน 2 ครั้งเป็นไปตามโปรโตคอลเดิมและให้ระยะเวลาในการสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มเติมจากการทดลองหลักเป็นเวลา 1 เดือน โดยใช้หนูในกลุ่มวัคซีน FimA ที่หยดวัคซีนทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส จำนวน 2 ตัว เป็นกลุ่มที่ใช้เทียบเคียงเป็นกลุ่มควบคุมลบของการทดลองย่อยนี้

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลองทำการวิเคราะห์หาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อฟิมเบรีย เอ ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสด้วยวิธีการอินไดเรกต์เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (Indirect ELISA) ในซีรัมสุดท้ายที่เก็บขณะการุณยฆาต(Final serum)ของการทดลองหลัก คงเหลือหนูทดลองจำนวน 29 ตัว โดยไม่มีกลุ่มควบคุมลบแต่ได้ทำการแยกหนูในกลุ่มที่ได้รับวัคซีน BCL ที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและการหยดทางจมูกอย่างละ 2 ตัว ซึ่งไม่ได้ถูกนำไปป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส เพื่อนำมาเป็นกลุ่มที่ใช้เปรียบเทียบกับแทน แต่หนูทดลองในกลุ่มอื่นๆได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส เหนี่ยวนำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบตามโปรโตคอลที่กำหนดไว้เหมือนเดิม โดยผลการทดลองจากการเก็บเลือดครั้งสุดท้ายที่เก็บขณะการุณยฆาตเพื่อทดสอบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะในซีรัม แสดงในภาพที่ 15



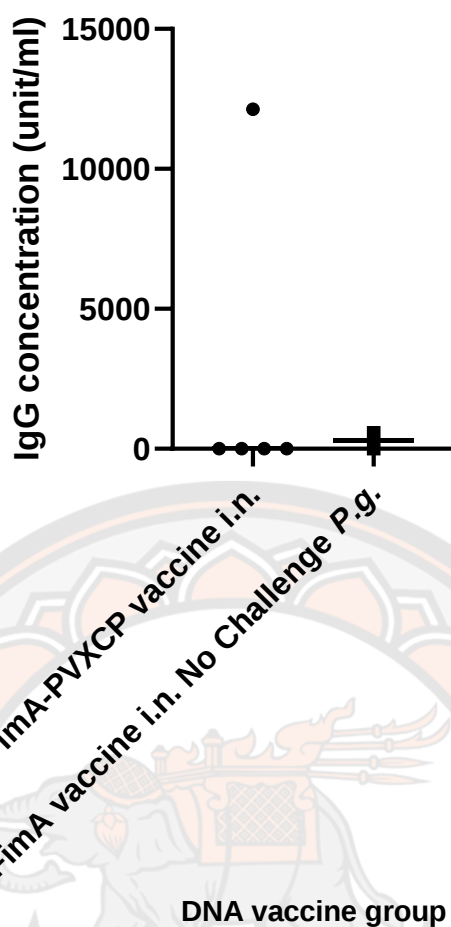
ภาพ 15 แสดงค่ามัธยฐานปริมาณแอนติบอดี IgG จำเพาะในซีรัม ครึ่งสุดท้ายที่เก็บขณะ การณษมาต(Final serum) ภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 87 (ยูนิต/มิลลิลิตร) FimA vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ทาง การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, FimA-PVXCP vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วย ดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ทาง การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, BCL vaccine i.m. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทาง การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, กลุ่ม BCL vaccine i.m. No challenge P.g. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทาง การฉีดเข้า กล้ามเนื้อ โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส, กลุ่ม P.g. challenge control หมายถึงกลุ่มที่ไม่ได้มีการให้วัคซีนใดๆ แต่ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส, FimA vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการหยดทาง จมูก, FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA- PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, BCL vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอ วัคซีน BCL ด้วยการหยดทางจมูก, กลุ่ม BCL vaccine i.n. No challenge P.g. คือ กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วยการหยดทางจมูก โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส, (* คือ $p < 0.05$ เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test)

เมื่อพิจารณาภาพรวมพบว่าเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากกว่าในซีรัมครั้งสุดท้ายที่เก็บขณะการุณยฆาต (Final serum) คือเทคนิคการฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูก พบว่าค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ต่อพิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในกลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อพบปริมาณไตเตอร์ของแอนติบอดี IgG ในซีรัมอยู่ในช่วง 9,669.72 -51,551.50 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกซึ่งไม่พบการสร้างแอนติบอดี IgG กล่าวคือพบ 0 หน่วย/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับกลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ พบปริมาณไตเตอร์ของแอนติบอดี IgG ในซีรัมอยู่ในช่วง 8,321.83 – 32,677.75 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกด้วยวัคซีนเดียวกัน โดยพบปริมาณไตเตอร์ของแอนติบอดี IgG ในซีรัมอยู่ในช่วง 0 - 74.69 หน่วย/มิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มวัคซีน BCL ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดทางกล้ามเนื้อ พบปริมาณไตเตอร์ของแอนติบอดี IgG ในซีรัมอยู่ในช่วง 2,665.88 – 31,272.52 หน่วย/ มิลลิลิตร แตกต่างจากเทคนิคกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวิธีหยดทางจมูกพบมีการสร้างแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมที่พบปริมาณเพียงเล็กน้อยโดยอยู่ในช่วง 0 - 456.39 หน่วย/มิลลิลิตร ดังนั้นเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดวัคซีนทางกล้ามเนื้อยังคงสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในซีรัมได้มากกว่า แม้ว่าจะระยะเวลาผ่านไปนานขึ้น

เมื่อพิจารณาแยกในแต่ละเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่าเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อไม่มีความแตกต่างกันของทั้ง 3 วัคซีนในทางสถิติ โดยวัคซีน FimA-PVXCP , FimA และ BCL สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) มีค่าไตเตอร์มัธยฐานของแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม 35,326 ,19,893 และ 24,555.64 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อ ก็ยังคงมีการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) เฉลี่ย 12,134 หน่วย/มิลลิลิตร โดยในทุกๆวัคซีนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูกสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) ในปริมาณที่น้อยมากหรือไม่สร้างเลย ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันของแต่ละวัคซีนเช่นกัน โดยพบว่าวัคซีน FimA-PVXCP, FimA และ BCL สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) โดยมีค่าไตเตอร์มัธยฐานของแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม 0 , 24.41และ 0 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน

จากภาพที่ 15 ยังแสดงให้เห็นถึงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ต่อพิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยกลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีปริมาณไตเตอร์มัยฐานของแอนติบอดี IgG ในซีรัม ประมาณ 35,326 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าในทุกกลุ่มวัคซีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูก และกลุ่ม *P.g. challenge control* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับกลุ่มวัคซีน FimA ด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีปริมาณไตเตอร์มัยฐานของแอนติบอดี IgG ในซีรัม ประมาณ 19,893 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าในทุกกลุ่มวัคซีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูก และกลุ่ม *P.g. challenge control* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน

ในขณะเดียวกันกลุ่มการทดลองย่อยที่ทำการทดสอบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะในวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูก ที่ได้มีการนำหนูทดลองมากระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีน FimA-PVXCP กระตุ้นเพิ่มจำนวน 2 ครั้ง กระตุ้นในระยะเวลาที่นานขึ้น ดังที่กล่าวไปแล้วเมื่อเทียบกับหนูในกลุ่มวัคซีน FimA ที่หยดทางจมูกโดยมีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส เป็นกลุ่มเทียบเคียงกลุ่มควบคุมลบของการทดลองย่อย พบปริมาณการสร้างแอนติบอดีจำเพาะในซีรัมครั้งสุดท้ายที่เก็บขณะการุณยฆาตของกลุ่มการทดลองย่อย ในวันที่ 115 ดังภาพที่ 16



ภาพ 16 แสดงค่ามัธยฐานปริมาณแอนติบอดี IgG จำเพาะในซีรัม ครึ่งสุดท้ายที่เก็บขณะ การรณยฆาต(Final serum) ของกลุ่มการทดลองย่อย ในวันที่ 115 (ยูนิต/มิลลิลิตร) FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, FimA vaccine i.n. no Challenge P.g. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้น ด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการหยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 มิลลิลิตร/ยูนิต และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

จากภาพที่ 16 ในกลุ่มการทดลองย่อย ที่ได้ทำการทดสอบวัคซีน FimA-PVXCP ที่หยดทางจมูกใน ระยะเวลาที่นานขึ้นและจำนวนครั้งที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มากขึ้น ผลที่ได้ยังคงแสดงให้เห็นว่า ปริมาณการสร้างแอนติบอดีจำเพาะของกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่หยดทางจมูกมีการสร้าง แอนติบอดีในปริมาณที่น้อยโดยพบว่ามีปริมาณแอนติบอดี IgG เข้าใกล้ศูนย์จำนวน 4 ตัว มีเพียง 1 ตัวที่มีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ประมาณ 12,131 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

2. การสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ จำเพาะในน้ำลาย (IgA)

ภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำ 1 สัปดาห์ โดยในวันที่ 22 ทำการเก็บน้ำลายมาตรวจการสร้างแอนติบอดีเช่นเดียวกับในซีรัมตามโปรโตคอล พบว่าในทุกเทคนิคของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของทั้ง 3 วัคซีน ไม่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA) ที่จำเพาะต่อฟิมเบรีย เอ ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส หรือสร้างในปริมาณที่น้อยมากในทุกๆกลุ่ม จึงทำการตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA) อีกครั้ง ในน้ำลายครั้งสุดท้ายก่อนการรณยฆาต (Final saliva)

เมื่อพบว่าการสร้างแอนติบอดี IgG ในซีรัมโดยเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูกมีปริมาณที่น้อย ประกอบกับผลการสร้างแอนติบอดี IgA ในน้ำลายที่ไม่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี IgA เลยในทุกกลุ่มการทดลองจึงมีการแยกกลุ่มการทดลองย่อยดังที่กล่าวไปแล้วเบื้องต้น

โดยหลังจากการกระตุ้นเพิ่ม ครั้งที่ 1 ในกลุ่มการทดลองย่อยเมื่อทำการเก็บน้ำลายเพื่อมาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA) ในน้ำลาย พบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของหนูในกลุ่มที่ได้รับวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก นั้นมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมลบ และไม่สามารถหาค่าได้เนื่องจากอยู่นอกขอบเขตของกราฟ Standard กล่าวคืออาจมีปริมาณแอนติบอดี IgA ในน้ำลายน้อยมาก หรือแทบไม่พบเลยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ดังตาราง 7

ตาราง 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มการทดลองย่อยภายหลังจากกระตุ้นเพิ่มครั้งที่ 1 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร							
อัตราส่วน (2 Fold dilution)	วัคซีน FimA-PVXCP หยดทางจมูก					วัคซีน FimA ฉีดเข้า กล้ามเนื้อ	กลุ่ม ควบคุม ลบ
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	กลุ่มควบคุม บวก	
1: 10	0.051	0.051	0.060	0.053	0.052	2.139	0.050
1: 20	0.050	0.048	0.049	0.047	0.052	2.151	0.059
1: 40	0.048	0.052	0.049	0.053	0.048	2.138	0.051
1: 80	0.048	0.047	0.048	0.050	0.054	2.090	0.055
1: 160	0.047	0.053	0.049	0.049	0.048		
1: 320	0.048	0.048	0.048	0.048	0.049		
1: 640	0.048	0.048	0.049	0.047	0.048		
1: 1280	0.052	0.051	0.063	0.049	0.049		

** หมายเหตุ กลุ่มควบคุมบวก เป็น แอนติบอดี IgG ของกลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ที่ทำบน
เพลตเดียวกัน

ในส่วนของการสร้างแอนติบอดีจำเพาะในน้ำลาย หรือ แอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA)
ของการทดลองหลักสามารถพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่ตรวจ
พบในน้ำลายก่อนการุณยฆาต (Final saliva) ดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มการทดลองหลัก ครั้งที่ท้ายก่อนการรณยฆาต
(Final saliva) ภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 87 ที่ความยาวคลื่น
450 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร																
อัตราส่วน (2 Fold dilution)	วัคซีน FimA โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ					วัคซีน FimA-PVXCP โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ					วัคซีน BCL โดยการฉีด เข้ากล้ามเนื้อ			วัคซีน BCL โดยการ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ไม่ป้ายเชื้อ		
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	
1: 10	0.071	0.073	0.107	0.075	0.089	0.229	0.142	0.090	0.080	0.200	0.092	0.125	0.125	0.101	0.203	
1: 20	0.079	0.071	0.105	0.071	0.076	0.173	0.085	0.087	0.086	0.143	0.086	0.103	0.114	0.107	0.116	
1: 40	0.076	0.073	0.115	0.070	0.069	0.117	0.071	0.079	0.089	0.122	0.079	0.106	0.092	0.089	0.091	
1: 80	0.082	0.073	0.184	0.074	0.079	0.096	0.071	0.072	0.073	0.093	0.074	0.088	0.091	0.081	0.086	
อัตราส่วน (2 Fold dilution)	P.g. Challenge control					วัคซีน FimA โดยการหยด ทางจมูก			วัคซีน FimA-PVXCP โดย การหยดทางจมูก			วัคซีน BCL โดยการ หยดทางจมูก			วัคซีน BCL โดยการหยดทาง จมูกไม่ป้ายเชื้อ	
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2		
1: 10	0.084	0.088	0.156	0.370	0.129	0.056	0.076	0.070	0.071	0.079	0.057	0.072		0.081	0.098	
1: 20	0.098	0.093	0.087	0.095	0.083	0.067	0.131	0.081	0.076	0.065	0.064	0.078		0.080	0.085	
1: 40	0.090	0.111	0.081	0.098	0.100	0.094	0.127	0.090	0.097	0.067	0.079	0.073		0.077	0.073	
1: 80	0.080	0.078	0.078	0.088	0.076	0.098	0.128	0.093	0.088	0.090	0.100	0.084		0.087	0.085	

จากตาราง 8 พบว่าในกลุ่มวัคซีนชนิดต่างๆในทุกๆกลุ่ม มีค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกับกลุ่ม P.g. Challenge control และเมื่อเทียบกลุ่มวัคซีน BCL โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและกลุ่มวัคซีน BCL โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อแต่ไม่ป้ายเชื้อมีค่าใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับกลุ่มวัคซีน BCL โดยการหยดทางจมูกและ กลุ่มวัคซีน BCL โดยการหยดทางจมูกแต่ไม่ป้ายเชื้อก็มีค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกัน อาจอนุมานได้ว่าปริมาณแอนติบอดี IgA ในน้ำลายน้อยมาก หรือแทบไม่พบเลย

ในส่วนการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะในน้ำลาย หรือ แอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ (IgA) ของการทดลองย่อยจากน้ำลายครั้งสุดท้ายก่อนการการรณยฆาต (Final saliva) พบค่าการดูดกลืนแสง ดังตาราง 9

ตาราง 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มการทดลองย่อย ครั้งที่ท้ายก่อนการฉายขาด
(Final saliva) ในวันที่ 115 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

อัตราส่วน (2 Fold dilution)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร						
	วัคซีน FimA-PVXCP โดยการหยดทางจมูก					วัคซีน FimA โดยการ หยดทางจมูก ไม่ป้ายเชื้อ	
	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2
1: 10	0.083	0.079	0.085	0.100	0.079	0.093	0.082
1: 20	0.085	0.103	0.084	0.122	0.119	0.077	0.103
1: 40	0.079	0.084	0.086	0.132	0.078	0.077	0.080
1: 80	0.089	0.082	0.081	0.105	0.132	0.077	0.083

จากตาราง 9 พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP โดยการหยดทางจมูกและกลุ่มวัคซีน FimA โดยการหยดทางจมูกที่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อฟอร์โฟโรโมแนส จิงจิวัลิส มีค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกันซึ่งอาจอนุมานได้ว่าปริมาณแอนติบอดี IgA ในน้ำลายน้อยมาก หรือแทบไม่พบเลยเช่นเดียวกับการทดลองหลัก แม้ว่าเพิ่มจำนวนครั้งในการกระตุ้น และทิ้งระยะเวลาให้นานมากขึ้นกว่าการทดลองหลัก

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟัน

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟันเพื่อทดสอบผลการป้องกันการละลายตัวของกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบด้วยเครื่อง Micro-CT รุ่น Skyscan 1173 ของบริษัท Bruker มีการพิจารณา 4 พารามิเตอร์ ได้แก่

1. ปริมาตรของกระดูกที่หลงเหลืออยู่โดยคิดเป็นร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตร ทั้งหมด (Percent Bone volume/Total volume, BV/TV)
2. ความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD)
3. ระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจากรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟันกับยอดของกระดูกเข้าฟัน (Distance Cementoenamel junction (CEJ) – Alveolar bone crest (ABC))
4. ร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss)

1. ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Percent BV/TV)

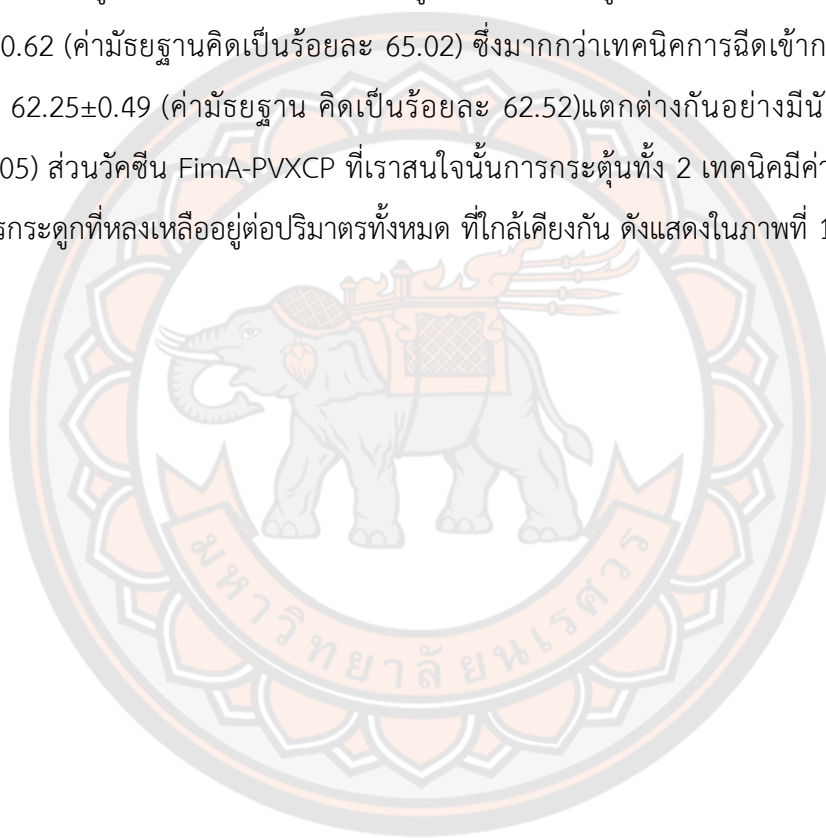
ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟันในกลุ่มการทดลองหลักที่มีหนูทดลองจำนวน 29 ตัว ซึ่งขอบเขตในการวิเคราะห์ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมดนั้น ครอบคลุมบริเวณด้านใกล้กลางของรากฟันใกล้กลาง ชื่อ M1 และ ใกล้กลางต่อจากรากฟันด้านใกล้กลาง ของชื่อ M 3 ประมาณ 2 มิลลิเมตร ขอบเขตด้านล่างคือปลายรากฟันของทุกซี่ลากเชื่อมต่อกันทั้งหมดจนถึง ขอบเขตด้านบนที่เป็นรอยต่อระหว่างเคลือบรากฟันแต่ละซี่และบริเวณสูงสุดของง่ามรากฟัน ในพารามิเตอร์ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมดนี้ หากมีค่าร้อยละที่สูงแปลผลได้ว่ามีปริมาตรกระดูกเหลืออยู่มาก ย่อมดีกว่ามีค่าที่น้อยอันเนื่องมาจากกระดูกถูกทำลายไป โดยพบว่า ในเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อของกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP, FimA และ BCL มี ค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด ร้อยละ 65.01 ± 0.53 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 64.77), 62.25 ± 0.49 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 62.52) และ 59.09 ± 1.80 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 59.21) ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อเปรียบเทียบในเทคนิคเดียวกัน การกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ พบว่าวัคซีน FimA-PVXCP ที่สนใจมีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมดมากที่สุดในทุกกลุ่มวัคซีนที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยมีความมากกว่ากลุ่ม P.g. challenge control ที่มีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด ร้อยละ 62.10 ± 1.88 (ค่ามัธยฐานคิดเป็นร้อยละ

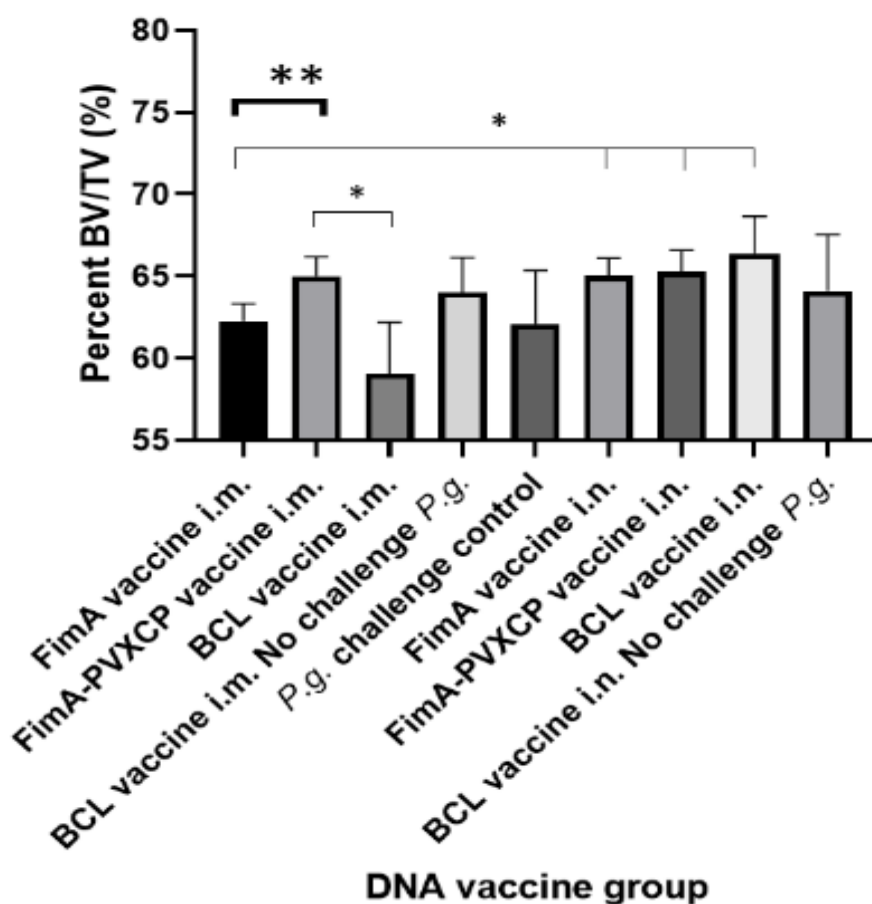
62.50) และมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มวัคซีนวัคซีน BCL ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ที่มีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมด ร้อยละ 64.04 ± 1.5 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 64.04) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่มีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมดซึ่งมีค่าน้อยที่สุดในทุกกลุ่มวัคซีน คิดเป็นร้อยละ 59.09 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 59.21) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้วัคซีน FimA-PVXCP ที่เราสนใจนั้นยังมีค่าเฉลี่ยร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมดมากกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมดเพียงร้อยละ 62.25 ± 0.49 (ค่ามัธยฐานคิดเป็นร้อยละ 62.52) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) อีกด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อ และกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ดูมีความแตกต่างกันมากกว่ากันแต่ก็ไม่พบว่าแตกต่างกันทางสถิติ

ในกลุ่มของวัคซีนที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูก พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP และ FimA มีค่าใกล้เคียงกันโดยมีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณ ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 65.29 ± 0.75 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 65.13) , 65.05 ± 0.62 (ค่ามัธยฐานคิดเป็นร้อยละ 65.02) ตามลำดับ ในขณะที่ กลุ่มวัคซีน BCL ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูกมี ค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมดสูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 66.39 ± 1.3 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 66.46) และเมื่อ พิจารณากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่เราสนใจซึ่งกระตุ้น ภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูกเทียบกับกลุ่ม *P.g. challenge control* ที่มีค่าเฉลี่ยของร้อยละ ปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมด ร้อยละ 62.10 ± 1.88 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 62.50) พบว่ามีค่ามากกว่าแต่น้อยกว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดวัคซีนทางจมูก และเมื่อเทียบกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดวัคซีนทางจมูก พบว่ามีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมดมากกว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดวัคซีนทางจมูกเหมือนกันแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยคิดเป็นร้อยละ 66.39 ± 1.3 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 66.46) และ 64.15 ± 2.42 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 64.15) ตามลำดับ ในทุกกลุ่มวัคซีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมดที่แตกต่างกันดังที่กล่าวไป แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

โดยเห็นว่าในพารามิเตอร์นี้ ร้อยละปริมาณกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาณทั้งหมด ในกลุ่มที่ใช้เทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูก มีค่าค่อนข้างมากกว่าเทคนิคการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และมีค่าที่

ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งทั้ง 2 เทคนิคนี้มีค่าร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด ห่างกันเล็กน้อย อยู่ในช่วงร้อยละ 62-66 โดยมีเพียงกลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตนเองภายในเทคนิค และหากเปรียบเทียบในวัคซีนชนิดเดียวกันแต่ต่างเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่ามีกลุ่มวัคซีน FimA และวัคซีน BCL ที่เทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูกที่มีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด สูงกว่าเทคนิคการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในวัคซีนตัวเดียวกัน โดยกลุ่มวัคซีน FimA ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันทางจมูกมีค่าร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 65.05 ± 0.62 (ค่ามัธยฐานคิดเป็นร้อยละ 65.02) ซึ่งมากกว่าเทคนิคการฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยมีค่าร้อยละ 62.25 ± 0.49 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 62.52) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนวัคซีน FimA-PVXCP ที่เราสนใจนั้นการกระตุ้นทั้ง 2 เทคนิคมีค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด ที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 17





ภาพ 17 แสดงค่ามัธยฐานร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด

(Percent Bone volume/Total volume, BV/TV)

FimA vaccine i.m. หมายถึงกลุ่ม ที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ทางการฉีดเข้า

กล้ามเนื้อ, FimA-PVXCP vaccine i.m. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน

FimA-PVXCP ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, BCL Vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วย

ดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, กลุ่ม BCL vaccine i.m. No challenge

P.g. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยไม่ได้รับ

การป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส, กลุ่ม P.g. challenge control หมายถึงกลุ่มที่

ไม่ได้มีการให้วัคซีนใดใด แต่ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส, FimA vaccine i.n.

หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการ หยดทางจมูก, FimA-PVXCP

vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอ วัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทาง

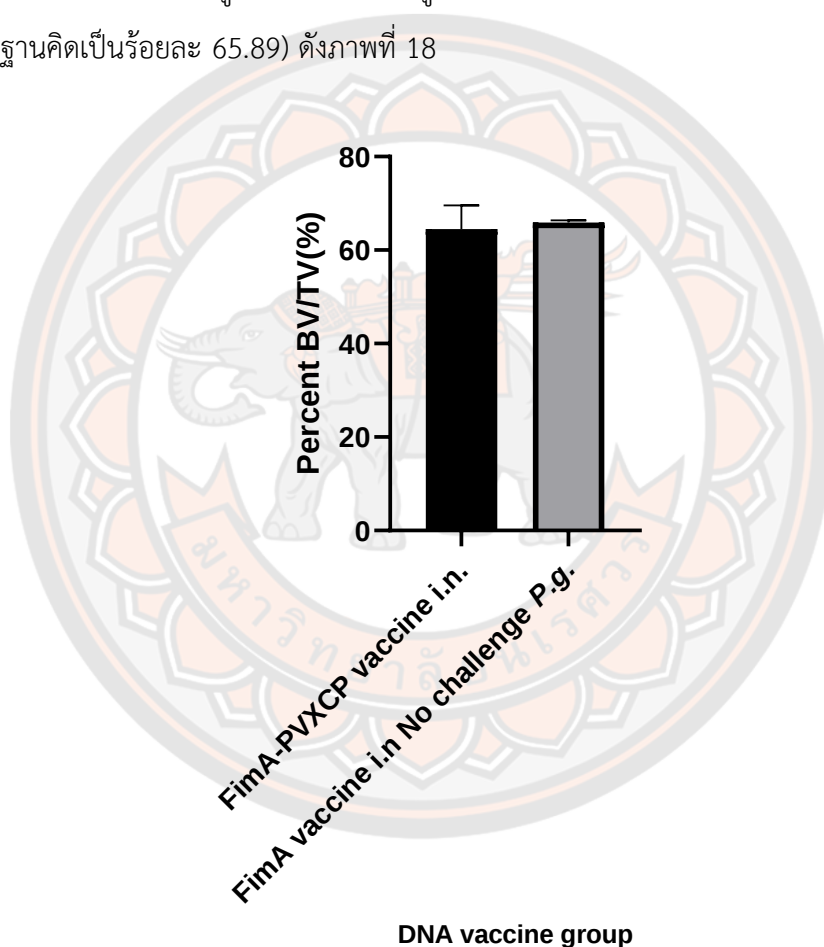
จมูก , BCL vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วยการหยดทาง

จมูก, BCL vaccine i.n. no challenge คือ กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วย

การหยดทางจมูก โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส, (* คือ $p < 0.05$,

** คือ $p < 0.01$ เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ Mann-Whitney U test)

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟันในกลุ่มการทดลองย่อย จำนวน 7 ตัว ใน พารามิเตอร์ร้อยละ ปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Percent BV/TV) พบว่ากลุ่ม วัคซีน FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการหยดทางจมูก มีค่าเฉลี่ยร้อยละของปริมาตรกระดูกที่ หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมดเป็นร้อยละ 65 ± 1.2 (ค่ามัธยฐานคิดเป็นร้อยละ 64.51) ซึ่งไม่แตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกลุ่มเทียบเคียงกลุ่มควบคุมลบคือกลุ่มวัคซีน FimA ที่หยดทางจมูกที่มี ค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ที่มีเฉลี่ย ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 65.89 ± 0.46 (ค่ามัธยฐานคิดเป็นร้อยละ 65.89) ดังภาพที่ 18



ภาพ 18 แสดงค่ามัธยฐานร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมดของกลุ่มการทดลองย่อย,

FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, FimA vaccine i.n. no challenge หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอ วัคซีน FimA ด้วยการหยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการ ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส

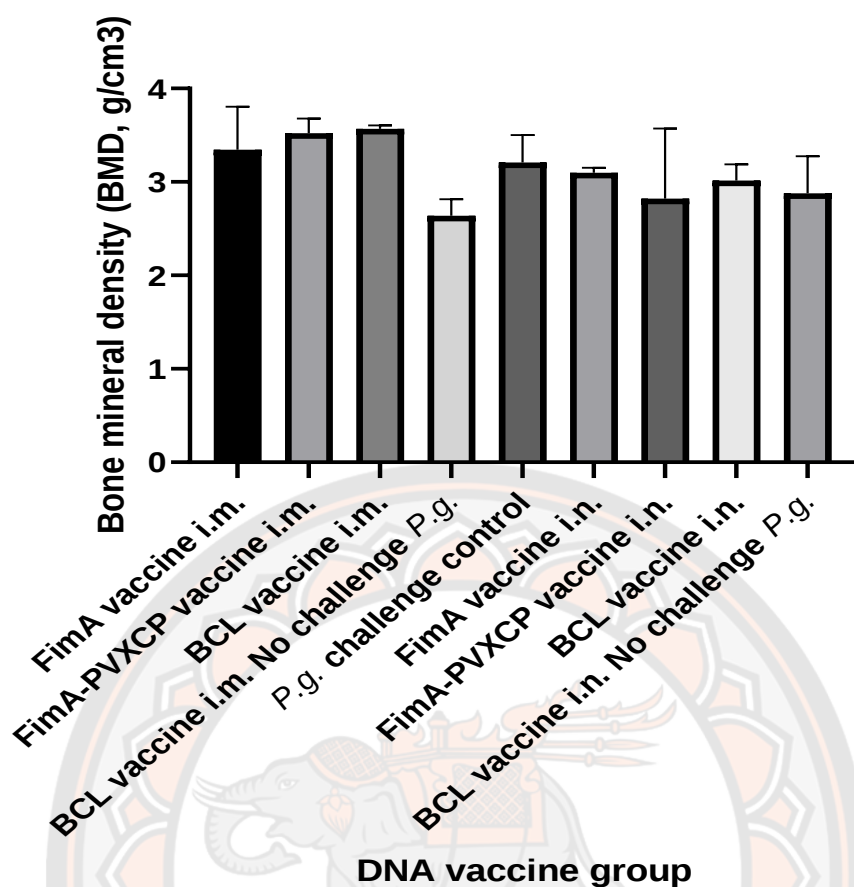
2. ความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD)

ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นของกระดูก ของกลุ่มการทดลองหลัก มีขอบเขตในการวิเคราะห์อยู่ระหว่างฟันซี่ M1 และ M2 โดยขอบเขตด้านใกล้กลางอยู่บริเวณด้านใกล้กลางของซี่ M1 ด้านใกล้กลาง อยู่บริเวณด้านใกล้กลางซี่ M2 ขอบเขตทางด้านบนเป็นรอยต่อระหว่างเคลือบผิวฟัน และเคลือบรากฟันของทั้ง 2 ซี่ลากเชื่อมต่อเนื่องโดยขอบเขตทางด้านล่าง ใช้ความยาวเพียงครึ่งหนึ่งของความยาวราก ในพารามิเตอร์ความหนาแน่นของกระดูกนี้ แปลผลได้ว่ายังมีค่าความหนาแน่นของกระดูกที่มีค่ามาก คือมีมวลกระดูกที่มีค่าใกล้เคียงไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) จำนวนมาก หากมวลกระดูกเหลือน้อยก็มีค่าน้อย โดยพบว่าความหนาแน่นกระดูกกลุ่มวัคซีนที่ให้โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าความหนาแน่นของกระดูกที่ค่อนข้างสูง พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP , FimA และ วัคซีน BCL มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูกเฉลี่ยคิดเป็น 3.46 ± 0.13 , 3.34 ± 0.13 และ 3.49 ± 0.1 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานความหนาแน่นคิดเป็น 3.52, 3.34 และ 3.57 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) โดยในกลุ่มวัคซีน FimA- PVXCP ที่เราสนใจเมื่อฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูก 3.46 ± 0.13 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร (ค่ามัธยฐานความหนาแน่นคิดเป็น 3.52 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) มากกว่า ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกลุ่ม P.g. challenge control ที่มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูก 3.02 ± 0.35 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร (ค่ามัธยฐานความหนาแน่นคิดเป็น 3.21 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) และกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ แต่ไม่ได้ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูกคิดเป็น 2.64 ± 0.17 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร (ค่ามัธยฐานความหนาแน่นคิดเป็น 2.64 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) โดยมีเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูกใกล้เคียง กับกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ และมากกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อด้วยเทคนิคเดียวกันแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาในกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส พบว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกลับมีความหนาแน่นของกระดูกมากกว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน

เมื่อพิจารณาเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูก พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA- PVXCP , FimA และ BCL ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการหยดทางจมูก มีค่าเฉลี่ย 3.06 ± 0.25 , 3.02 ± 0.11 และ 3.01 ± 0.1 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานความหนาแน่นคิดเป็น 2.82, 3.10 และ 3.02 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA- PVXCP ที่เราสนใจเมื่อ

กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูก มีค่าเฉลี่ยที่มีค่าความคลาดเคลื่อนของการวัดที่ค่อนข้างกว้าง และมีค่ามัธยฐานความหนาแน่นของกระดูกน้อยกว่ากลุ่ม *P.g. challenge control* และกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดทางจมูกแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส ที่มีความหนาแน่นของกระดูกเฉลี่ย 3.02 ± 0.35 และ 2.88 ± 0.4 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานความหนาแน่นคิดเป็น 3.21 และ 2.88 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) ดังแสดงในกราฟที่ 6 อีกทั้งมีความหนาแน่นของกระดูกน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มวัคซีน FimA และวัคซีน BCL ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูกแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาในกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดวัคซีนทางจมูก มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูกมากกว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดทางจมูกแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

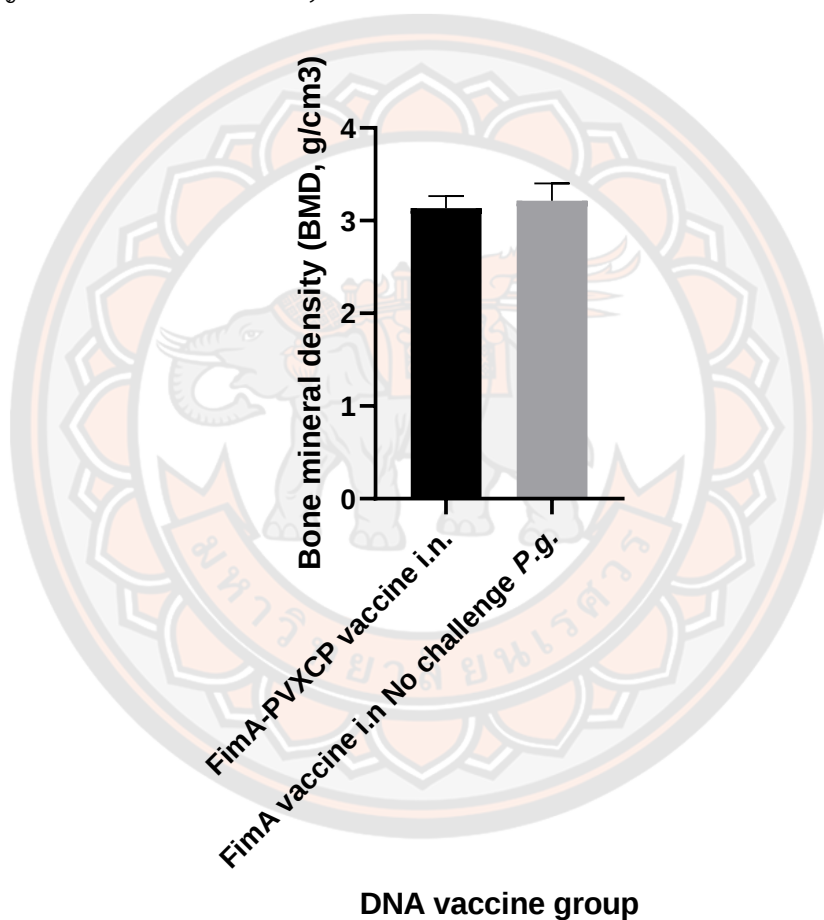
หากพิจารณาเทียบในวัคซีนชนิดเดียวกันแต่คนละเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันพบว่า ในทุกๆ วัคซีนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ วัคซีน FimA-PVXCP, FimA และ BCL เมื่อกระตุ้นด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีค่าความหนาแน่นของกระดูกที่มากกว่าเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูก แต่ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพ 19 แสดงค่ามัธยฐานความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD)

FimA vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, FimA-PVXCP vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, BCL vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, กลุ่ม BCL vaccine i.m. No challenge P.g. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส, กลุ่ม P.g. challenge control หมายถึงกลุ่มที่ไม่ได้มีการให้วัคซีนใดๆ แต่ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส, FimA vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการหยดทางจมูก, FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, BCL vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วยการหยดทางจมูก, กลุ่ม BCL vaccine i.n. no challenge คือกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วยการหยดทางจมูก โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นของกระดูก ของกลุ่มการทดลองย่อย พบว่าความหนาแน่นของกระดูกในกลุ่มวัคซีน FimA PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันทางจมูก มีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูกใกล้เคียงกับกลุ่มที่ใช้เทียบเคียงกลุ่มควบคุมลบคือกลุ่มวัคซีน FimA ที่หยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจึงวลิส โดยมีค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของกระดูก 3.14 และ 3.21 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานความหนาแน่นคิดเป็น 3.14 และ 3.21 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร) โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mann-Whitney U test) ดังแสดงภาพที่ 20



ภาพ 20 แสดงค่ามัธยฐานความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineral density, BMD) ของกลุ่มการทดลองย่อย,

FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA- PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, *FimA vaccine i.n. no challenge* หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการหยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/ มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจึงวลิส

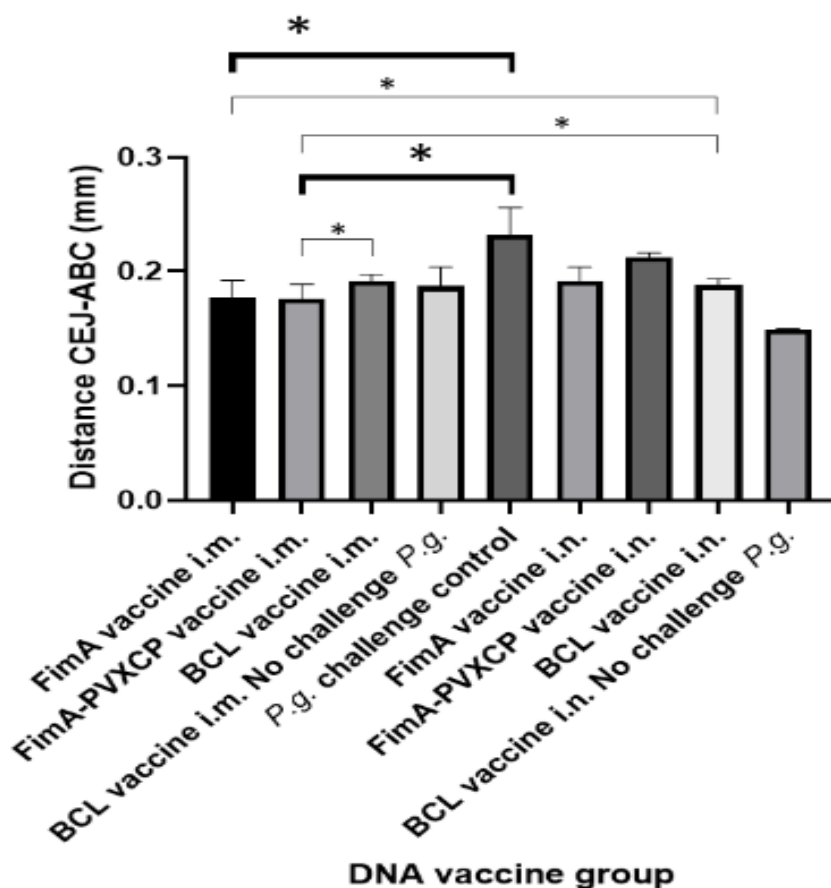
3. ระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน กับ ยอดของกระดูกเขี้ยวฟัน (Distance Cementoenamel junction (CEJ) – Alveolar bone crest (ABC))

ผลการวิเคราะห์ระยะเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน กับ ยอดของกระดูกเขี้ยวฟัน หรือระยะการละลายตัวของกระดูก (Bone loss) ในพารามิเตอร์นี้หากมีการทำลายกระดูกของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ก็มีระยะการเปลี่ยนแปลงที่มาก หากไม่ค่อยมีการทำลายก็มีระยะการเปลี่ยนแปลงที่น้อย เมื่อพิจารณาเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อ พบว่าในกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP, FimA และวัคซีน BCL มีค่าเฉลี่ยของระยะการละลายตัวของกระดูก 0.176 ± 0.001 , 0.177 ± 0.001 และ 0.192 ± 0.003 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเป็น 0.182, 0.173 และ 0.195 มิลลิเมตร และมีความยาวรากเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มจากภาพรังสีคิดเป็น 0.86, 0.9 และ 0.98 มิลลิเมตร ตามลำดับ) ซึ่งกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่เราสนใจมีค่าการละลายตัวของกระดูกที่น้อยกว่าแตกต่างกับกลุ่ม *P.g. challenge control* ที่มีการละลายตัวของกระดูกเฉลี่ย 0.23 ± 0.01 มิลลิเมตร (ค่ามัธยฐานระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเป็น 0.23 มิลลิเมตร และมีความยาวรากเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มจากภาพรังสีคิดเป็น 0.95 มิลลิเมตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อีกทั้งยังมีการละลายตัวของกระดูกน้อยกว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสซึ่งมีการละลายตัวของกระดูกเฉลี่ย 0.188 ± 0.01 มิลลิเมตร (ค่ามัธยฐานระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเป็น 0.188 มิลลิเมตร และมีความยาวรากเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มจากภาพรังสีคิดเป็น 0.94 มิลลิเมตร) และเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละวัคซีนพบว่า กลุ่มที่ได้รับวัคซีน FimA-PVXCP ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าการละลายตัวของกระดูกน้อยกว่า กลุ่มวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ด้วยเช่นกัน ส่วนของกลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีค่าเฉลี่ยของระยะการละลายตัวของกระดูกที่น้อยกว่าแตกต่างกับกลุ่ม *P.g. challenge control* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นกัน เมื่อพิจารณากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อ และกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส มีค่าการละลายตัวที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.192 ± 0.003 และ 0.188 ± 0.01 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูก พบว่าในกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP, FimA และวัคซีน BCL มีค่าเฉลี่ยของระยะการละลายตัวของกระดูก 0.213 ± 0.002 , 0.192 ± 0.007 และ 0.188 ± 0.003 มิลลิเมตรตามลำดับ (ค่ามัธยฐานระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเป็น 0.214,

0.195 และ 0.187 มิลลิเมตร และมีความยาวรากเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มจากภาพรังสีคิดเป็น 0.96, 1.00 และ 0.97 มิลลิเมตร) โดยกลุ่ม FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกมีค่าเฉลี่ยของระยะการละลายตัวของกระดูกน้อยกว่ากลุ่ม *P.g.* challenge control แต่มากกว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดทางจมูกแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ที่มีค่าการละลายตัวของกระดูกเฉลี่ย 0.15 ± 0.0002 มิลลิเมตร (ค่ามัธยฐานระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเป็น 0.15 มิลลิเมตร และมีความยาวรากเฉลี่ยจากภาพรังสีคิดเป็น 0.88 มิลลิเมตร) เมื่อพิจารณาในกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดทางจมูก และกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดทางจมูกแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส พบว่ามีค่าการละลายตัวของกระดูกที่ค่อนข้างแตกต่างกันมาก

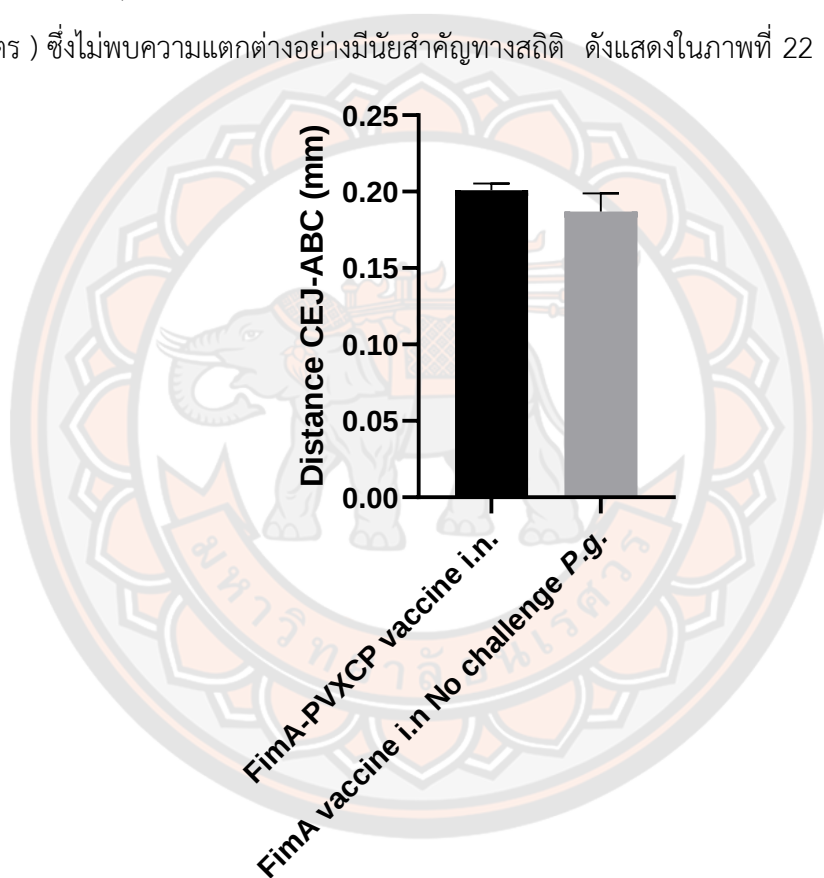
เมื่อพิจารณาเทียบในวัคซีนตัวเดียวกัน ทั้งวัคซีน FimA-PVXCP และ FimA ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่ละเทคนิค พบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดวัคซีนเข้าทางกล้ามเนื้อ มีค่าการละลายตัวของกระดูกที่น้อยกว่าเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูกแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ส่วนของกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ พบการละลายตัวของกระดูกมากกว่าเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูกเล็กน้อยไม่พบความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพ 21 แสดงค่ามัธยฐานระยะเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟันกับยอดของกระดูกเบ้าฟัน (Distance Cementoenamel junction – Alveolar bone crest)

FimA vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, FimA-PVXCP vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, BCL vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, กลุ่ม BCL vaccine i.m. No challenge P.g. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส, กลุ่ม P.g. challenge control หมายถึงกลุ่มที่ไม่ได้มีการให้วัคซีนใดใด แต่ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส, FimA vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการหยดทางจมูก, FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, BCL vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วยการหยดทางจมูก, กลุ่ม BCL vaccine i.m. & i.n. no challenge คือคือกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและหยดทางจมูก โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส (* คือ $p < 0.05$ เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test)

ผลการวิเคราะห์ระยะเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน กับยอดของกระดูกเบ้าฟัน หรือระยะการละลายตัวของกระดูก (Bone loss) ของกลุ่มการทดลองย่อย พบว่ากลุ่ม FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกและกลุ่มที่ใช้เทียบเคียงกลุ่มควบคุมคือกลุ่มวัคซีน FimA ที่หยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส มีค่าเฉลี่ยของระยะการละลายตัวของกระดูก 0.201 ± 0.001 และ 0.187 ± 0.008 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานระยะการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเป็น 0.201, 0.187 มิลลิเมตร และมีความยาวรากเฉลี่ยจากภาพรังสีคิดเป็น 1.01 และ 1.00 มิลลิเมตร) ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 22



DNA vaccine group

ภาพ 22 แสดงค่ามัธยฐานระยะเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวัดจาก รอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟันกับยอดของกระดูกเบ้าฟัน (Distance Cementoenamel junction – Alveolar Bone crest) ของกลุ่มการทดลองย่อย, FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, FimA vaccine i.n. no challenge หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการหยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส

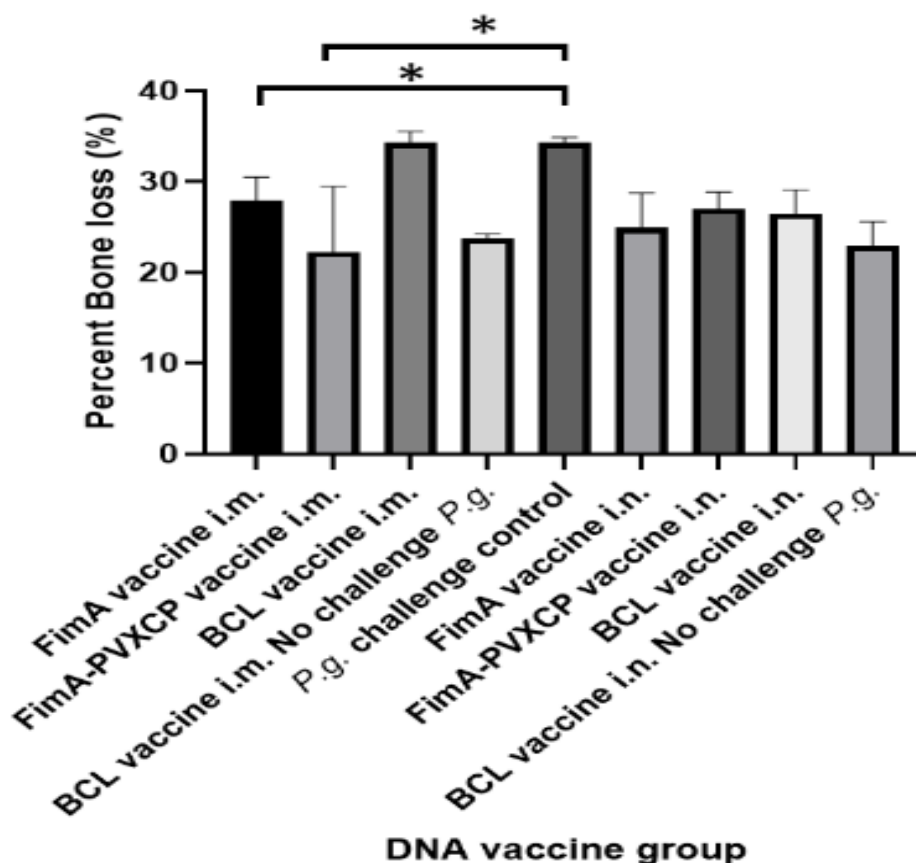
4. ร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss)

ผลการวิเคราะห์ร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากการวัดระยะยอดกระดูกเบ้าฟันจนถึงปลายรากฟัน เทียบกับระยะรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน โดยคิดเป็นร้อยละ ในพารามิเตอร์นี้หากมีการทำลายของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่มาก ก็ทำให้ค่าร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟันมากไปด้วย หากทำลายน้อยค่านี้นี้ก็มีค่าน้อย ซึ่งพบว่าเทคนิคในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ของกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP , FimA และ วัคซีน BCL มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน คิดเป็น ร้อยละ 23.6 ± 1.83 , 26.88 ± 1.36 และ 29.86 ± 5.08 ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันคิดเป็นร้อยละ 22.21, 27.96 และ 34.30) โดยพบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP มีค่าการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกในกลุ่ม *P.g.* challenge control ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน คิดเป็น ร้อยละ 34.29 ± 0.33 (ค่ามัธยฐานของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันคิดเป็นร้อยละ 34.28) และน้อยกว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวาลิส ที่มี ค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน คิดเป็น ร้อยละ 23.78 ± 0.48 (ค่ามัธยฐานของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันคิดเป็นร้อยละ 23.78) ซึ่ง เมื่อทำการเทียบกันในกลุ่มวัคซีนทั้ง 3 ชนิด กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP มีค่าร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อ เทียบกับความยาวรากฟันน้อยที่สุด นอกจากนี้กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP และกลุ่ม FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกที่น้อยเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน กว่ากลุ่ม *P.g.* challenge control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP และ FimA ในขณะที่กลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกมากที่สุดในกลุ่มทดลอง โดยมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกสูง ใกล้เคียงกับกลุ่ม *P.g.* challenge control ซึ่งมีร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวราก ฟันแตกต่างกับกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อแต่ไม่ได้ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสเป็นอย่างมากแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ในส่วนขอเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูกด้วยวัคซีน FimA-PVXCP, วัคซีน FimA และ วัคซีน BCL พบว่ามีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อ

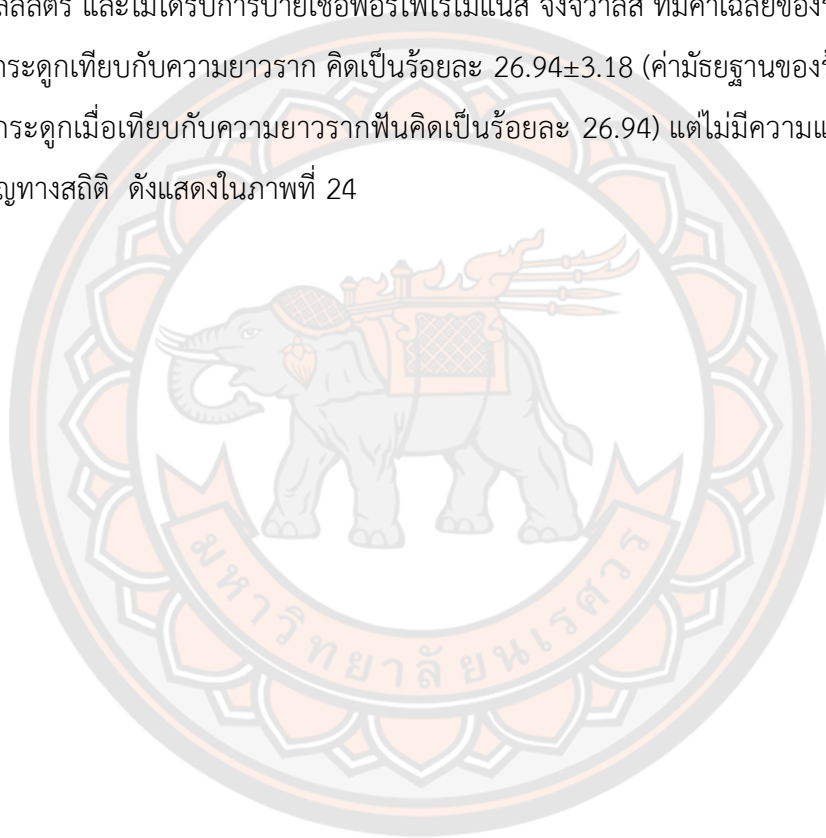
เทียบกับความยาวรากฟัน ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 26.07 ± 1.94 , 24.74 ± 2.36 และ 25.29 ± 2.61 ตามลำดับ (ค่ามัธยฐานของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันคิดเป็นร้อยละ 26.98, 24.88 และ 26.46) เมื่อพิจารณาในกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่เราสนใจมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม *P.g.* challenge control แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเทียบกับกลุ่ม BCL ที่หยุดทางจมูกแต่ไม่ได้มีการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสพบว่าการละลายตัวมากกว่า โดยกลุ่มวัคซีน BCL หยุดทางจมูกแต่ไม่ได้มีการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนสจึงจิวาลิส มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน ร้อยละ 22.94 ± 2.68 (ค่ามัธยฐานของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันคิดเป็นร้อยละ 22.94) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ในกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยุดทางจมูก และกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยุดทางจมูกแต่ไม่ได้ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส พบว่ามีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน ไม่แตกต่างกันมาก

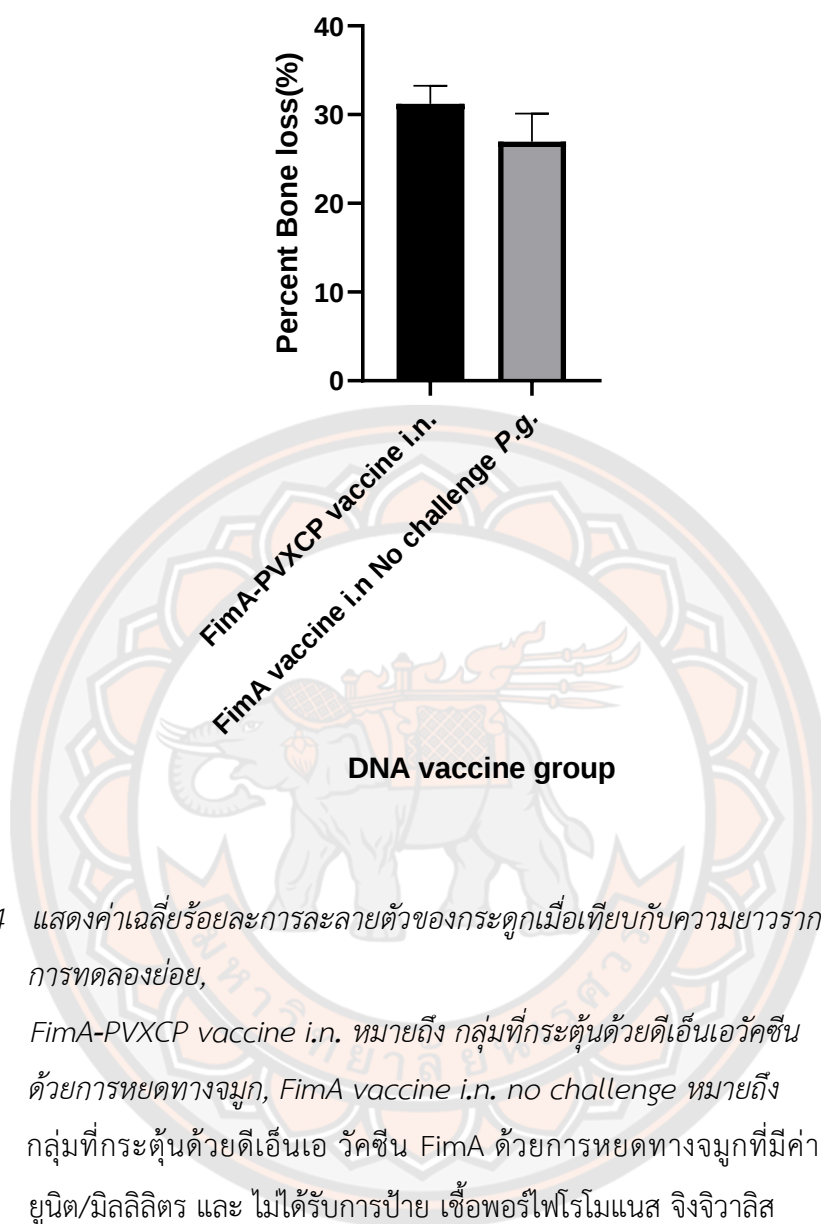
เมื่อทำการเปรียบเทียบในวัคซีนชนิดเดียวกันแต่คนละเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน น้อยกว่าวิธีการหยุดวัคซีนเข้าทางจมูก ในขณะที่กลุ่มวัคซีน FimA และ BCL การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการหยุดวัคซีนทางจมูกมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันที่น้อยกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพ 23 แสดงค่าร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน FimA vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, FimA-PVXCP vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, BCL vaccine i.m. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ, กลุ่ม BCL vaccine i.m. No challenge P.g. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส, กลุ่ม P.g. challenge control หมายถึงกลุ่มที่ไม่ได้มีการให้วัคซีนใดใด แต่ป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส, FimA vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA ด้วยการหยดทางจมูก, FimA-PVXCP vaccine i.n. หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน FimA-PVXCP ด้วยการหยดทางจมูก, BCL vaccine i.n. หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วยการหยดทางจมูก, กลุ่ม BCL vaccine i.n. no challenge หมายถึงกลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน BCL ด้วยการหยดทางจมูกและไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส (* คือ $p < 0.05$ เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่ม ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test)

ในส่วนผลการวิเคราะห์การละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss) ของกลุ่มการทดลองย่อย พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกมีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวราก ร้อยละ 30.54 ± 1.23 (ค่ามัธยฐานของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันคิดเป็นร้อยละ 31.23) มากกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วยวัคซีน FimA โดยการหยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส ที่มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวราก คิดเป็นร้อยละ 26.94 ± 3.18 (ค่ามัธยฐานของร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันคิดเป็นร้อยละ 26.94) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 24





ภาพ 24 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟันของกลุ่มการทดลองย่อย, *FimA-PVXCP vaccine i.n.* หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอวัคซีน *FimA- PVXCP* ด้วยการหยดทางจมูก, *FimA vaccine i.n. no challenge* หมายถึง กลุ่มที่กระตุ้นด้วยดีเอ็นเอ วัคซีน *FimA* ด้วยการหยดทางจมูกที่มีค่าแอนติบอดีเป็น 0 ยูนิต/มิลลิลิตร และ ไม่ได้รับการป้าย เชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส

บทที่ 5

บทสรุป

ดีเอ็นเอวัคซีนเป็นวัคซีนที่มีการใช้ดีเอ็นเอของแอนติเจนในเชื้อจุลชีพเชื่อมต่อกับพลาสมิดซึ่งสามารถแทรกซึมเข้าไปภายในเซลล์ของร่างกายได้ โดยมีข้อดีคือ สามารถทำให้เกิดการตอบสนองของร่างกายโดยใช้เพียงส่วนหนึ่งของแอนติเจนของเชื้อเท่านั้น หลีกเลี่ยงการใช้วัคซีนที่เป็นเชื้อก่อโรคที่มีชีวิตแต่ทำให้อ่อนแรงหรือวัคซีนดีเอ็นเอที่ใช้ไวรัสเป็นเวกเตอร์ โดยมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ค่อนข้างสูง สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immunity) และการตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (Humoral immunity) สามารถผลิตได้ง่าย ดีเอ็นเอมีความเสถียรในธรรมชาติสามารถเลือกตำแหน่งลำดับยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เป็นแอนติเจนที่ต้องการได้อย่างจำเพาะ และยังสามารถใช้ร่วมกับวิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันวิธีอื่นๆ ได้ (Rimi Najeeb, 2020) อาจมีข้อจำกัดในเรื่องความแรงในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในมนุษย์ แม้ว่าจะมีความปลอดภัยในการใช้แต่ยังขาดการศึกษาในระยะยาว ความซับซ้อนในการใช้เวกเตอร์ที่มากกว่า 1 ชนิด (กัญญา ศุภปิติพร., 2558) โดยกลไกในการทำงานของดีเอ็นเอวัคซีนเมื่อเข้าสู่ร่างกายมีเซลล์เป้าหมายหลักคือเดนไดรติกเซลล์ ซึ่งพบได้ในหลายตำแหน่งที่ผิวหนัง เยื่อจมูก ปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้ รวมถึงในกระแสเลือด วัคซีนดีเอ็นเอที่เข้าไปในเดนไดรติกเซลล์ กระตุ้นกระบวนการทรานสคริปชัน และทรานสเลชันในนิวเคลียสให้เซลล์สร้างโปรตีนแอนติเจน โปรตีนแอนติเจนที่สร้างใหม่นี้ ถูกแสดงออกบนผิวเซลล์ผ่านการควบคุมด้วยยีนของกลุ่มเมเจอร์ฮิสโตคอมแพททิบิลิตี ประเภท 1 และ 2 (MHC I, MHC II) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนจากวัคซีนดีเอ็นเอในร่างกายแบบจำเพาะทั้งแบบพึ่งเซลล์ (Cell mediated immunity) ผ่าน MHC I และแบบพึ่งสารน้ำ (Humoral immunity) ซึ่งทำหน้าที่หลักผ่านแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน ผ่าน MHC II ที่แสดงแอนติเจนจากวัคซีนดีเอ็นเอจับกับตัวรับของเซลล์ทีลิมโฟไซต์ชนิด CD4+ หรือชนิด Helper T cell หลังไซโตไคน์กระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B cell ให้เกิดการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนนั้นออกมา (Liu MA., 2011) เมื่อเชื้อก่อโรคเช่นพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส เข้าสู่ร่างกายหลังได้รับวัคซีน ระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งสารน้ำสามารถสร้างแอนติบอดีมาต่อต้านเชื้อได้อย่างรวดเร็วซึ่งมีความน่าสนใจที่เป็นทางเลือกในการป้องกันโรคปริทันต์อักเสบวิธีหนึ่ง

จากการศึกษาย้อนหลังที่ผ่านมาการใช้ FimA เป็นแอนติเจนในพลาสมิดดีเอ็นเอ 3 ในการผลิตวัคซีนดีเอ็นเอ ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และฉีดเข้าต่อมน้ำลายโดยตรง พบว่า วัคซีน FimA ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีการสร้างแอนติบอดี

อิมมูโนโกลบูลินจี ในซีรัม ส่วนการฉีดเข้าต่อมน้ำลายโดยตรงพบแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลินจีในซีรัม พบอิมมูโนโกลบูลินจี และ เอ ในน้ำลาย (Kawabata S, et al., 1999) และยังมีการศึกษาที่กระตุ้น ภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูก ของวัคซีนดีเอ็นเอ FimA ในหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิดการสร้าง แอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม และแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ ในน้ำลาย (Yu F. et al., 2011) แสดงให้เห็นว่าวัคซีน FimA สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้จริง ซึ่งการทดลองนี้มีรูปแบบการ ทดลอง วัคซีนดีเอ็นเอ แอนติเจนที่สนใจ อายุ เพศและสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองใกล้เคียงกันกับการ ทดลองในครั้งนี้ อาจใช้กลุ่มวัคซีน FimA นี้เทียบเคียงว่าเป็นกลุ่มที่ สามารถกระตุ้นการสร้าง แอนติบอดีจำเพาะได้ ใช้ในการดูแนวโน้มค่าไคเฮอร์ของแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในการทดลองครั้งนี้ว่ามี ประสิทธิภาพเป็นอย่างไรเมื่อเทียบวัคซีน FimA-PVXCP ที่เราสนใจ

โดยในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของวัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส (FimA-PVXCP vaccine) ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยพิจารณาจาก

1. ปริมาณแอนติบอดีต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
2. ผลการป้องกันการละลายตัวของกระดุกเป่าฟัน

สรุปผลการวิจัย

วัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส (FimA-PVXCP vaccine) ที่ฉีดเข้าทาง กล้ามเนื้อ มีประสิทธิภาพสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มีการสร้างแอนติบอดี IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในซีรัม ได้เทียบเท่ากับวัคซีน FimA และพบว่าสามารถคงระดับ IgG ได้ เมื่อเวลาผ่านไป และกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ สามารถป้องกันการละลายตัว ของกระดุกได้ดีกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ

วัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ชนิด FimA-PVXCP vaccine ที่ฉีดเข้าทาง กล้ามเนื้อ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้มีการสร้างแอนติบอดี IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในซีรัมได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกใน สัตว์ทดลองได้ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบในแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ Mann-Whitney U test) และมี ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี IgG ได้ใกล้เคียงกับกลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้า กล้ามเนื้อ แต่พบว่ามีปริมาณแอนติบอดี IgG มากกว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป

วัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส ชนิด FimA-PVXCP vaccine ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อสามารถป้องกันการละลายตัวของกระดูกเข้าฟันในสัตว์ทดลองได้ และมีประสิทธิภาพในการป้องกันการละลายตัวของกระดูกใกล้เคียงกับวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ โดยมีระยะการละลายตัวที่วัดจากรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟันถึงยอดกระดูกเข้าฟัน ที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.176 ± 0.001 และ 0.177 ± 0.001 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนในแต่ละพารามิเตอร์อื่นๆ ทั้งความหนาแน่นของกระดูก(BMD) และร้อยละการละลายตัวของกระดูกเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss) พบวัคซีนดีเอ็นเอต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิส ชนิด FimA-PVXCP vaccine ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีประสิทธิภาพในการป้องกันการละลายตัวของกระดูกได้ดีกว่าเล็กน้อย โดยมีเพียงพารามิเตอร์ค่าเฉลี่ยร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมดที่มีค่ามากกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมดเพียงร้อยละ 62.25 ± 0.49 (ค่ามัธยฐาน คิดเป็นร้อยละ 62.52) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

อภิปรายผลการทดลอง

การเพิ่มภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกายในการป้องกันการเกิดโรคปริทันต์ นับเป็นทางเลือกในการป้องกันและรักษาโรคปริทันต์อักเสบ เนื่องจากโรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคเรื้อรัง ที่เกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีการเสียสมดุลไป จากการศึกษาพบว่าผลการทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธีการอินไดเรกต์เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (Indirect ELISA) การทดลองหลักแสดงให้เห็นว่า กลุ่มวัคซีน FimA ที่ใช้เป็นกลุ่มวัคซีนเปรียบเทียบ เมื่อทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิคการฉีดเข้ากล้ามเนื้อสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลิสได้ หลังจากให้วัคซีนครั้งที่ 2 และในซีรัมครั้งสุดท้ายขณะการุณยฆาต (Final serum) โดยพบค่าไตเตอร์มัธยฐานของแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม 37,742.22 และ 19,893 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yu และคณะที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้โดยที่กลุ่ม FimA กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน IgG อยู่ในช่วงประมาณ 10,000 – 40,000 ยูนิต/มิลลิลิตรเช่นกัน (Yu et al., 2011) และเมื่อพิจารณาการสร้างแอนติบอดี อิมมูโนโกลบูลิน IgG ในซีรัมหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 เปรียบเทียบกับในซีรัมครั้งสุดท้ายขณะการุณยฆาต (Final serum) พบว่าในกลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีค่าลดลง จาก 37,742.22 เหลือเพียง 19,893 ยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่ กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP มีค่าที่มากขึ้น โดยมีค่า

19,973 หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และเพิ่มเป็น 35,326 ยูนิต/มิลลิลิตร ในตอนสุดท้าย พบว่าช่วงหลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 พบหนูมีการตอบสนองต่อวัคซีน FimA และ FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อคิดเป็นร้อยละ 60 และเมื่อระยะเวลาผ่านไป ในการทดสอบการสร้างแอนติบอดีในซีรัมครั้งสุดท้ายขณะการุณยฆาตพบว่าหนูทุกตัวมีการตอบสนองต่อวัคซีนทั้ง 2 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 100 แต่การตอบสนองในกลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงค่ามาตรฐานหรือน้อยกว่า มีเพียง 1 ตัวที่มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 32,677.75 ยูนิต/มิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีค่าเกาะกลุ่มกันอยู่ที่ 35,326 ยูนิต/มิลลิลิตร หรือมากกว่า มีเพียง 1 ตัว ที่มีค่าน้อยสุดอยู่ที่ 9,669.71 ยูนิต/มิลลิลิตร

จากการทดลองพบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิคหยดทางจมูก ของทั้งวัคซีน FimA-PVXCP และวัคซีน FimA ตรวจไม่พบการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี หรือสร้างในปริมาณต่ำใกล้เคียง 0 ยูนิต/มิลลิลิตร อาจเนื่องมาจากความแตกต่าง ในการดูดซึมปริมาณแอนติเจน กลไกการทำงาน และตำแหน่งที่กระตุ้น แอนติเจนที่นำมาใช้กระตุ้นผ่านเยื่อจมูกในการศึกษานี้มีปริมาณน้อยกว่าโดยใช้ปริมาณ 100 ไมโครกรัม ฉีดครั้งละ 50 ไมโครกรัม จำนวน 2 ครั้ง ความถี่ในการฉีดครั้งที่ 2 ห่างกับครั้งแรก 2 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับปริมาณแอนติเจนใช้กระตุ้นทางต่อมน้ำลาย ในการศึกษาของ Kawabata และคณะ ที่ใช้ปริมาณ 200 ไมโครกรัม ฉีดครั้งละ 50 ไมโครกรัม กระตุ้นจำนวน 4 ครั้ง ความถี่ฉีดสัปดาห์ละสองครั้ง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัมด้วยการฉีดเข้าทางต่อมน้ำลายอย่างมีนัยสำคัญ (Kawabata et al., 1999) แม้ว่าปริมาณแอนติเจนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ที่ใช้เท่ากับการศึกษาของ Yu และคณะ แต่อาจมีข้อแตกต่างในส่วนของพลาสมิดที่ Yu และคณะใช้พลาสมิดเป็น ไซโตทอกซิก ที ลิมโฟไซต์ ที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจน 4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 , CTLA4) ที่ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนดีเอ็นเอ ทางจมูกแล้วสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ในซีรัม และแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน เอ ในน้ำลายได้ แต่ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ใช้พลาสมิด คือ pcDNA3 ซึ่งได้มีการเพิ่มการกระตุ้นด้วยวัคซีนดีเอ็นเอให้มากขึ้นในการทดลองย่อยแล้ว และยังเพิ่มระยะเวลาให้นานขึ้น แต่ก็ยังไม่พบการสร้างแอนติบอดีจำเพาะในซีรัม หรือน้ำลาย ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะห่างของเวลาก็มีผล เนื่องจากทั้งระยะพักไม่เท่ากันจึงไม่สามารถเปรียบเทียบได้ ปัจจัยในเรื่องการกระตุ้นซ้ำอาจเนื่องมาจากการกระตุ้นในครั้งแรก เป็นการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนที่จำเพาะ โดยสามารถกระตุ้นไซโตทอกซิก ที ลิมโฟไซต์ (Cytotoxic T lymphocytes, CTL) ที่เป็นการกระตุ้นผ่านการตอบสนองภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immunity) ได้ด้วย ไม่ใช่แค่

กระตุ้น Helper T cell หลัง Cytokine ให้ B cell ตอบสนองต่อ แอนติเจนด้วยการสร้างแอนติบอดีไปจัดการเชื้อโรคเท่านั้น จึงต้องมีการกระตุ้นซ้ำในลักษณะเดียวกับ Prime-boost vaccination กระตุ้นซ้ำเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการให้วัคซีน (Bolhassani & Yazdi, 2009) การออกแบบการกระตุ้นซ้ำว่าทำมาน้อยแค่ไหน ขึ้นอยู่กับการตอบสนองของ T cell โดยใน T cell ที่เจริญเต็มที่แล้วมีความซับซ้อนและหลากหลายในช่วงชีวิตหนึ่ง หากไม่ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน เซลล์ ที่ไม่เคยได้รับการกระตุ้น (Naïve T cell) มีค่าครึ่งชีวิตอยู่ระหว่าง 3 สัปดาห์ ถึง 3 เดือน ซึ่งปัจจัยการอยู่รอดก็แตกต่างกันออกไป ในสัตว์ทดลองเมื่อถูกกระตุ้นจากแอนติเจนในครั้งแรกแล้ว มีค่าครึ่งชีวิตของ T cell ที่น้อยอยู่ได้เพียงไม่กี่วัน (Few days) แต่หากกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันร่วมกับสารอื่นๆ แล้วทำให้ค่าครึ่งชีวิตของ T cell เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จะเรียกสารเหล่านั้นว่า Adjuvant นั่นเอง (Marrack et al., 1998) ซึ่ง Adjuvant คือสารที่ใส่เข้าไปในร่างกายร่วมกับแอนติเจน มีคุณสมบัติในการเป็น ผู้ช่วยให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อแอนติเจนได้ดีขึ้น มีประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีน โดยเฉพาะกรณีที่วัคซีนมีความเป็นอิมูโนเจนที่ต่ำหรือมีปริมาณแอนติเจนที่น้อย เพราะ Adjuvant จะช่วยให้แอนติเจนอยู่ได้นานในร่างกายส่งเสริมให้ Co-stimulatory molecule มากขึ้น โดยการใส่ Adjuvant จำนวนครั้ง ชนิดและปริมาณแอนติเจนที่ใช้กระตุ้นซ้ำก็แตกต่างกันออกไปในหลายๆการศึกษา

ในเทคนิคการกระตุ้นผ่านเยื่อจมูกนี้สามารถใช้ปริมาณแอนติเจนน้อยได้ (Vajdy & O'Hagan, 2001) ถือเป็นข้อดีของการกระตุ้นทางเยื่อจมูก การให้วัคซีนสะดวก ไม่ผ่านเมตาบอลิซึมรอบแรก (Zaman, Chandrudu, & Toth, 2013) การผ่านเมตาบอลิซึมรอบแรก (First pass metabolism)เป็นกระบวนการกำจัดยาออกจากร่างกายเมื่อยาเคลื่อนจากเส้นเลือดจากลำไส้เล็กเข้าสู่ตับ ถูกดักจับด้วยเอนไซม์ต่างๆแล้วถึงเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกาย (Robertson, 2017) ซึ่งการผ่านเมตาบอลิซึมรอบแรกนี้ ก็เป็นการส่งผลต่อชีวปริมาณสารออกฤทธิ์ (Bioavailability)หรือชีวประสิทธิผล ที่เป็นปริมาณยาจริงๆที่สามารถเข้าสู่กระแสเลือดได้ (Systemic circulation) แต่การให้ทางจมูกก็อาจมีปัญหาโดยมีอุปสรรคคือกลไกการป้องกันตัวของโพรงจมูก คือชั้นนอกสุดมีชั้นเยื่อเมือกที่ประกอบไปด้วย Ciliated columnar cells, Non-ciliated columnar cells, Goblet cells และ Basal cells ซึ่งสัดส่วนแตกต่างกันไปตามตำแหน่งของโพรงจมูก โดย Goblet cells ผลิตเยื่อเมือกมาเป็นสิ่งกีดขวางทางกายภาพ ป้องกันสิ่งแปลกปลอมรวมไปถึงวัคซีนดีเอ็นเอด้วย ภายในเยื่อเมือกยังประกอบไปด้วย โกลโคโปรตีน เอนไซม์ อิมมูโนโกลบูลิน เกลือ โปรตีนและส่วนประกอบที่เป็นไขมัน (Kalinin, Marom, Patow, & Shelhamer, 1984; Xu, Yuen, & Lam, 2014) อาจทำให้การ

ได้รับวัคซีนเข้าสู่ร่างกายได้น้อยลง หรือถูกย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ที่หลั่งออกมา และแม้ว่าการศึกษาส่วนใหญ่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ แต่มีบางการศึกษาที่กล่าวถึงบทบาทสำคัญของเซลล์เดนไดรติก ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายของวัคซีนดีเอ็นเอว่าสามารถนำเข้าสู่แอนติเจนและแสดงออกของ Encode protein ผ่านทางเทคนิคการฉีดวัคซีนดีเอ็นเอเข้ากล้ามเนื้อได้ดีกว่า (Chattergoon et al., 2000; Dupuis et al., 2000) เนื่องจากมีความแตกต่างด้านกายวิภาคศาสตร์ ส่วนประกอบระดับเซลล์ของทั้งโพรงจมูกและกล้ามเนื้อ จึงกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี IgG ในปริมาณที่ต่ำกว่าการกระตุ้นผ่านทางกล้ามเนื้อหรือต่อมน้ำลายที่ควรเป็น ทำให้วัคซีนดีเอ็นเอเข้าสู่ร่างกายได้ในปริมาณต่ำ ทำให้ดีเอ็นเอวัคซีนพบกับเดนไดรติกเซลล์น้อย ส่งผลให้มีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะได้น้อย เมื่อเทียบกับกับการให้วัคซีนดีเอ็นเอทางกล้ามเนื้อซึ่งมีโอกาสถูกดูดซึมเข้าสู่ เซลล์ในกล้ามเนื้อเพิ่มโอกาสและปริมาณวัคซีนดีเอ็นเอที่เข้าสู่ร่างกาย นอกจากนั้นการที่ตรวจไม่พบปริมาณแอนติบอดีหรือพบในปริมาณต่ำผ่านการหยดทางจมูกยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาการกระตุ้น จำนวนครั้งที่กระตุ้น ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ เทคนิคขั้นตอนที่มีความละเอียดอ่อน ซึ่งในการทดลองนี้ไม่มีกลุ่มควบคุมบวกสำหรับการกระตุ้นเยื่อบุจมูก เนื่องจากเป็นการศึกษานำร่อง จึงยากแก่การที่สรุปว่าวัคซีน FimA และวัคซีน FimA-PVXCP ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางเยื่อบุจมูกได้

ในกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อพบมีการสร้างแอนติบอดีเกิดขึ้น ทั้งที่วัคซีน BCL เป็นวัคซีนควบคุมลบที่ไม่น่าจะเกิดการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ โดยพบปริมาณแอนติบอดี IgG ประมาณ 7,396 ยูนิต/มิลลิลิตร อาจเกิดจากการจับกับโมเลกุลอื่น (Cross link) เกิดเป็นแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะเจาะจง (Nonspecific antibody IgG) โดยแอนติบอดีที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลบวกหลวง (False positive) การที่พบปริมาณแอนติบอดี IgG ขึ้นมาในปริมาณหนึ่ง อาจเนื่องมาจากมีสารตั้งต้นเอนไซม์ หรือโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นของวัคซีน ทำให้มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ทดสอบ (Affinity) แต่อาจไม่มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) อย่างที่ควรเป็น สามารถจับกันได้อย่างหลวมๆและตรวจพบได้โดยเทคนิคที่ใช้ ในการตรวจสอบการจับกันทางภูมิคุ้มกันวิทยาพิจารณาถึง ความสามารถในการจับกันภายใน (Intrinsic affinity) คือการจับกันของ Epitope และ Antigen binding site 1 พันธะ ส่วนฟังก์ชันของความสามารถในการจับกัน (Functional affinity) คือความแข็งแรงในการจับกันของแอนติบอดีหลายๆตัว และยังพิจารณาถึงความแข็งแรงของการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนทั้งโมเลกุล (Avidity) (Klasse, 2016) การทดสอบ Affinity ของ Monoclonal antibody สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Label-free interaction analysis ซึ่งใช้ศึกษา

ปฏิกิริยาระหว่างสารชีวโมเลกุล ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ปรากฏการณ์ของแสงเป็นหลัก ได้แก่ surface plasmon resonance (SPR) and bio-layer interference (BLI) เป็นต้น (R. L. Petersen, 2017)

แอนติบอดีจำเพาะที่ร่างกายสร้างขึ้นแบ่งได้เป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ ได้แก่ อิมมูโนโกลบูลินจี เอ ดี อี และเอ็ม อิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) เป็นแอนติบอดีที่ถูกสร้างได้ในปริมาณมากที่สุดสามารถพบได้ในซีรัมพบได้ถึงร้อยละ 10-20 ของพลาสมาโปรตีนทั้งหมด และเมื่อเทียบกับแอนติบอดีชนิดอื่น โดยสามารถแบ่ง อิมมูโนโกลบูลินจี ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ IgG1, IgG2, IgG3 และ IgG4 โดย IgG2 มีบทบาทในการตอบสนองต่อแอนติเจน จากแบคทีเรีย ระดับซีรัมเฉลี่ยในผู้ใหญ่ที่พบได้มาก คือ IgG1 และ IgG2 ส่วน IgG3 สามารถกระตุ้นคอมพลีเมนต์ได้ดี โดยส่วนใหญ่แล้ว IgG มีค่าครึ่งชีวิตอยู่ประมาณ 21 วัน (Vidarsson, Dekkers, & Rispens, 2014) ดังแสดงในตารางที่ 9 ในขณะที่อิมมูโนโกลบูลิน เอ พบได้มากในน้ำลายซึ่งอยู่ในช่องปากบริเวณผิวฟันและเยื่อเมือกช่องปาก แต่เข้าสู่ร่องเหงือกส่วนที่ลึกไม่มาก ในการต่อต้านโรคปริทันต์เกี่ยวข้องกับอิมมูโนโกลบูลิน จี ในน้ำเหลืองเหงือก (Gingival crevicular fluid, GCF) และอิมมูโนโกลบูลิน เอ ในน้ำลาย ซึ่งอิมมูโนโกลบูลิน จี ที่วัคซีนดีเอ็นเอผลิตได้อาจ สามารถจัดการกับเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยการ Opsonization ที่มักอยู่ในร่องเหงือกลึกได้ ส่งผลให้ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สูญเสียไป ไม่เกิดการรวมกลุ่มของ เชื้อก่อโรค อาจช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้โรคปริทันต์อักเสบดีขึ้น

ตารางที่ 9 แสดงคุณสมบัติกลุ่มย่อยของ อิมมูโนโกลบูลิน จี ในมนุษย์

	แอนติบอดี IgG1	แอนติบอดี IgG2	แอนติบอดี IgG3	แอนติบอดี IgG4
ข้อมูลทั่วไป				
มวลโมเลกุล (กิโลดัลตัน)	146	146	170	146
กรดอะมิโนบริเวณ ข้อพับ	15	12	62 ^a	12
พันธะไดซัลไฟด์ ระหว่างสายหนัก	2	4 ^b	11 ^a	2
ระดับซีรัมเฉลี่ยใน ผู้ใหญ่ (กรัม/ลิตร)	6.98	3.8	0.51	0.56
ร้อยละความชุก สัมผัส	60	32	4	4
ค่าครึ่งชีวิต (วัน)	21	21	7/~21 ^a	21
การถ่ายทอดผ่าน นรก	++++	++	++/++++ ^a	+++
การตอบสนองของ แอนติบอดีต่อ :				
โปรตีน	++	+/-	++	++ ^c
โพลีแซคคาไรด์	+	+++	+/-	+/-
สารก่อภูมิแพ้	+	(-)	(-)	++
การกระตุ้นคอมพลี เมนต์				
การจับกับ C1q	++	+	+++	-

a หมายถึง ขึ้นอยู่กับ Allotype

b หมายถึง A/A ไอโซเมอร์

c หมายถึง หลังจากกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจนซ้ำ ส่วนใหญ่เป็นสารก่อภูมิแพ้

แอนติบอดี IgG ในซีรัมมีบทบาทสำคัญเป็นบทบาทหลักในการป้องกันโรคปริทันต์อักเสบด้วย วัคซีนดีเอ็นเอในการทดลองนี้ เมื่อดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย คือ เซลล์ไดเรกเตอร์เซลล์ ที่เป็นเซลล์ นำเสนอแอนติเจน (Antigen presenting cell) เมื่อเข้าสู่นิวเคลียส เกิดการ Transcription และ Translation แอนติเจนที่เราก่อแบบไว้ มีการนำเสนอผ่าน MHC II โดยจับกับ CD4 T cell หลัง Cytokine ให้ B cell ตอบสนองต่อแอนติเจนด้วยการสร้างแอนติบอดี เป็นการกระตุ้นผ่านการ ตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยใช้สารน้ำ (Humoral immunity) สร้างแอนติบอดีขึ้น โดยในซีรัม ผ่าน ทาง หลอดเลือดบริเวณเหงือก คือ Supraperiosteal vessel ไปยัง Vascular plexus ที่ใกล้กับ Junctional epithelium เข้าสู่บริเวณร่องเหงือกจัดการกับเชื้อโรคในร่องเหงือก ในการจับติด ช่วยใน การกลืนทำลายได้ง่ายขึ้น (Opsonization) กระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการทำลายแอนติเจน (Complement activation) นอกจากนี้แอนติบอดียังมีความสามารถในการลบล้างฤทธิ์ (Neutralization) ของแอนติเจน และปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (Agglutination) อีกด้วย

หากพิจารณาผลของการวิเคราะห์หาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อพิมเบรีย เอ ของเชื้อฟอร์โฟโร โมแนส จิงจิวัลิส โดยเปรียบเทียบในวัคซีนตัวเดียวกัน ในช่วงเวลาภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ครั้งที่ 2 ในวันที่ 22 และครั้งสุดท้าย ขณะการุณยฆาต (Final serum) พบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP มีปริมาณแอนติบอดีจำเพาะสูงขึ้น จาก 19,973 หน่วย/มิลลิลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 35,326 หน่วย/ มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 63 วัน หรือประมาณ 2 เดือน ในขณะที่กลุ่มของวัคซีน FimA มีปริมาณ แอนติบอดีจำเพาะลดลง จาก 37,742.22 หน่วย/มิลลิลิตร เป็น 19,893 หน่วย/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาผ่านไป กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ใน ปริมาณที่มากกว่า แม้ว่าจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หากพิจารณา ถึงการกระจาย ตัวของข้อมูลทั้งในกลุ่มของวัคซีน FimA ที่มีหนู จำนวน 1 ตัวที่มีค่าสูงกว่าปกติ และกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่มีหนูจำนวน 1 ตัวที่มีค่าปริมาณแอนติบอดีที่ต่ำกว่าทุกตัวในกลุ่มเป็นอย่างมาก ซึ่ง สาเหตุอาจมาจากการตอบสนองของหนูแต่ละตัวที่มีไม่เท่ากัน ส่งผลทำให้การคำนวณทางสถิติไม่เกิด ความแตกต่างกัน หากเราเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างของหนูเพิ่มมากขึ้นอาจเห็นความแตกต่างของกลุ่ม วัคซีนทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ชัดเจนขึ้น โดยอาจกล่าวได้ว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ แต่มีข้อดีที่เห็นได้ชัด คือเมื่อ ระยะเวลาผ่านไประดับ IgG ยังคงอยู่ในระดับใกล้เคียงกับหลังจากการกระตุ้นครั้งแรกเพิ่มปริมาณ ขึ้นมาเล็กน้อย โดยสังเกตได้ว่าในซีรัมที่เก็บครั้งสุดท้ายขณะการุณยฆาตนั้น มีหนูจำนวน 4 ตัว ใน จำนวน 5 ตัว ที่มีค่าไตเตอร์แอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ใกล้เคียง 35,000 หน่วย/มิลลิลิตร และบาง

ตัวค่าไตเตอร์แอนติบอดีเพิ่มมากขึ้นอยู่ที่ประมาณ 47,000 – 51,000 หน่วย/มิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มวัคซีนFimA ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อ แม้สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ได้สูงมาก หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งแรกแต่ก็พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป จากการเก็บซีรัมครั้งสุดท้ายขณะการุณยฆาตก็พบว่าหนูจำนวน 4 ตัว จากจำนวน 5 ตัวในกลุ่มทดลอง มีค่าไตเตอร์แอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี ลดลงมาอยู่ในช่วง 20,000 หน่วย/มิลลิลิตร หรือต่ำกว่า มีเพียงจำนวน 1 ตัวที่มีค่าไตเตอร์แอนติบอดีอิมมูโนโกลบูลิน จี สูงสุดคือ 32,677.75 หน่วย/มิลลิลิตร ซึ่งดูจากแนวโน้มแล้วกลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เหมาะสำหรับการที่ฉีดกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันในโรคเรื้อรัง อย่างปริทันต์อักเสบได้ดีกว่า

นอกจากนี้สังเกตได้ว่ากลุ่ม *P.g. challenge control* นั้น ในช่วงเวลาภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 22 พบมีการสร้างแอนติบอดี IgG ในหนูเพียง 1 ตัว ในปริมาณที่น้อยมาก คือ 138.12 หน่วย/มิลลิลิตรและในครั้งสุดท้าย ขณะการุณยฆาต (Final serum) ไม่พบการสร้างแอนติบอดี IgG ขึ้นเลย อาจแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ไม่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ตามธรรมชาติ หรืออาจสร้างได้ในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการต่อต้านการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ จึงทำให้เกิดการดำเนินของโรคต่อไป

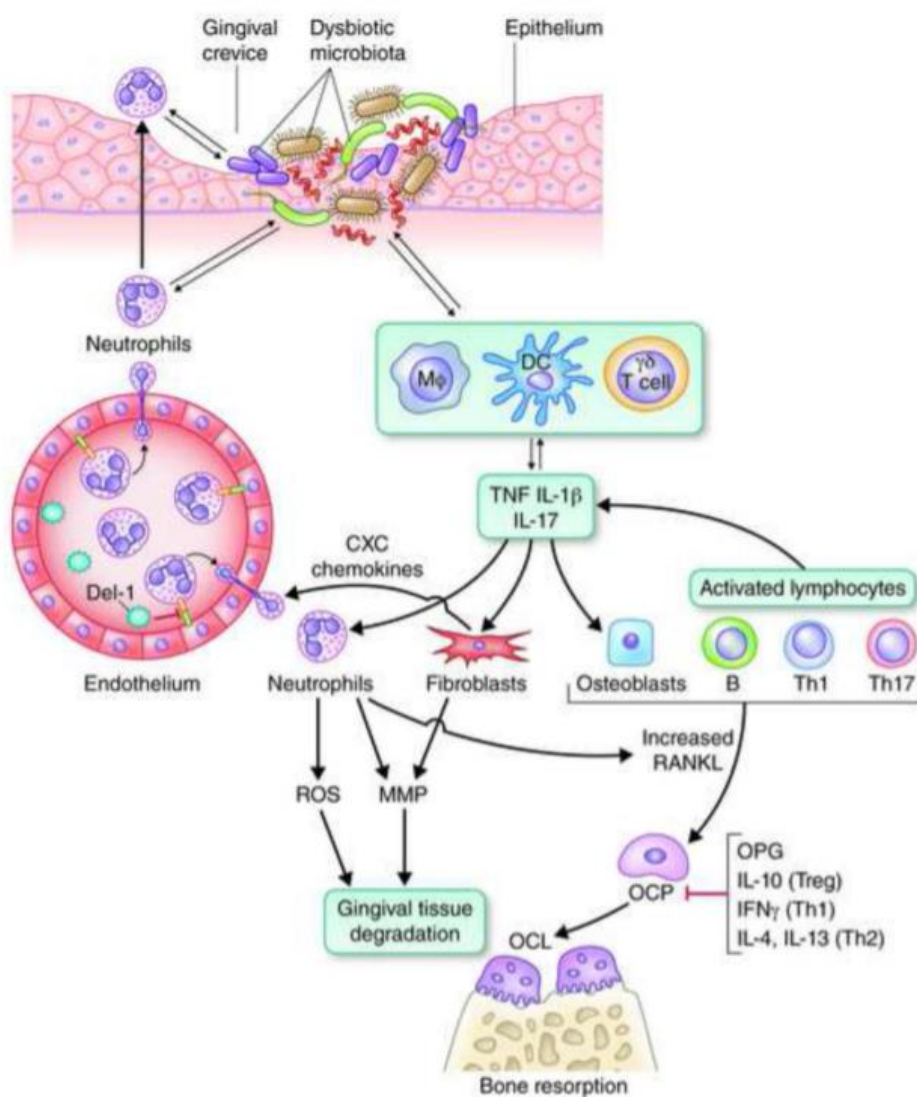
ในการวิเคราะห์หาแอนติบอดีในซีรัมสุดท้าย ที่เก็บขณะการุณยฆาต (Final serum) ก็พบแนวโน้มปริมาณการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อฟิมเบรีย ของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส เช่นเดิม คือ วัคซีนที่ให้ด้วยเทคนิคการหยดทางจมูก พบปริมาณการสร้างแอนติบอดีจำเพาะที่น้อย หรือไม่สร้างเลย ในขณะที่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ โดยพบว่ากลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP มีการสร้างแอนติบอดี IgG ที่จำเพาะต่อฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส สูงขึ้นกว่าเดิม เป็น 35,326 หน่วย/มิลลิลิตร กลุ่มวัคซีน FimA สร้างลดลง โดยพบแอนติบอดีจำเพาะประมาณ 19,893 หน่วย/มิลลิลิตรแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ โดยพบว่ากลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อและหยดทางจมูกแต่ไม่ได้รับการป้ายเชื้อพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ก็ยังคงมีแอนติบอดีอยู่เช่นเดิม 2 ตัวที่มาจากการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ มีค่ามัธยฐานของปริมาณแอนติบอดีจำเพาะลดลงเป็น 2,812 หน่วย/มิลลิลิตร

หากเปรียบเทียบกับการศึกษาวัคซีนที่มีการเชื่อมต่อ PVXCP สำหรับโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง และโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีโลมา พบว่า PVXCP เป็นตัวช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้นทั้ง 2 ชนิด โดยมีระดับการตอบสนองแตกต่างกันไป ในโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองช่วยเหนี่ยวนำในการ

ตอบสนอง ร้อยละ 50 ของหนูทดลอง ในขณะที่โรคกระดูกอักเสบเม็ดเลือดขาวมัยอโลมา ตอบสนองสูงถึง ร้อยละ 90 ของหนูทดลอง โดยพบค่ามัธยฐานของปริมาณไตเตอร์ของแอนติบอดีโรคกระดูกอักเสบเม็ดเลือดขาวมัยอโลมา ประมาณ 30,000 ยูนิต/มิลลิลิตร (Savelyeva N., et al., 2001) ในขณะที่วัคซีน FimA-PVXCP มีค่ามัธยฐานของปริมาณไตเตอร์ของแอนติบอดี ประมาณ 19,973 ยูนิต/มิลลิลิตร ภายหลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 ในวันที่ 22 และพบว่าแอนติบอดีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 35,326 ยูนิต/มิลลิลิตร ในการวิเคราะห์หาแอนติบอดีในซีรัม ครั้งสุดท้าย ขณะการุณยฆาต (Final serum)

ในส่วนของการทดลองย่อยที่แยกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ด้วยวิธี หยอดทางจมูก โดยใช้วัคซีนที่สนใจทดลอง พบว่าวัคซีน FimA-PVXCP ที่หยอดทางจมูกมีการสร้างแอนติบอดีเข้าใกล้ศูนย์จำนวน 4 ตัว มีเพียง 1 ตัวที่มีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อฟิมเบรียของ พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ประมาณ 12,131 ยูนิต/มิลลิลิตร แม้มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพิ่มจำนวน 2 ครั้ง รวมเป็นทั้งหมด 4 ครั้ง และวิเคราะห์หาแอนติบอดีในซีรัมครั้งสุดท้ายที่เก็บขณะการุณยฆาต ในวันที่ 115 เป็นการยืนยันว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวัคซีน FimA-PVXCP ที่หยอดทางจมูก สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ได้น้อย

บทบาทของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคปริทันต์ อักเสบ เป็นผลจากการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ เซลล์เดนไดรติก ให้หลั่งสารสื่ออักเสบต่างๆได้แก่ อินเตอร์ลูคิน 1 เบต้า (IL-1 Beta) , ทูเมอร์ เนโครซิสแฟกเตอร์ อัลฟา (TNF alpha) และอินเตอร์ลูคิน 17 (IL-17) ไปกระตุ้น Osteoblast เซลล์ลิ้มโฟไซด์ ได้แก่ บี เซลล์ (B cell) เซลล์ทีเฮลเปอร์ 1 (T helper 1, Th1 cell) และเซลล์ทีเฮลเปอร์ 17 (T helper 17, Th17 cell) กระตุ้นให้ตัวรับ RANK (RANK receptor) บนผิว Osteoclast precursor จับกับ RANKL (RANK Ligand) บนผิวของ Osteoblast หรือบนผิวของ Stromal cell ทำให้ Osteoclast precursor กลายเป็น Osteoclast ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น Osteoclast ให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้เกิดการละลายของกระดูกมากขึ้น ส่งผลให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในภาพรังสีบริเวณยอดสันกระดูกบริเวณที่ใกล้ต่อไบโอฟิล์ม และมีการสร้างกระดูกที่ลดลงของ Osteoblast ในขณะเดียวกันเซลล์เม็ดเลือดขาว นิวโทรฟิล และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) มีการหลั่งเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรติเอส (Matrix metalloproteinase, MMP) คอลลาจีเนส (Collagenase) ทำให้เกิดการทำลายส่วนของ เมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) ภายในเหงือกและกระดูกเบ้าฟัน ส่งผลให้ความหนาแน่นของกระดูกลดลง ดังภาพที่ 25 (Hajishengallis, 2014)



ภาพ 25 แสดงกลไกที่นำไปสู่การทำลายของกระดูกในโรคปริทันต์อักเสบ

จากการทดลองพบมีการทำลาย เปลี่ยนแปลงระดับของกระดูกเข้าฟัน สามารถวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟันด้วยเครื่อง Micro CT โดยแบ่งค่าพารามิเตอร์ออกเป็น 4 พารามิเตอร์ ได้ดังตารางที่ 10

ตาราง 10 แสดงสรุปผลการเปลี่ยนแปลงของกระดูกในแต่ละพารามิเตอร์

	Percent BV/TV (%)	BMD (g/cm ³)	Distance (mm)	Percent Bone loss (%)
FimA vaccine i.m.	62.25±0.49	3.34±0.13	0.177±0.001	26.88±1.36
FimA PVXCP vaccine i.m.	65.01±0.53	3.46±0.13	0.176±0.001	23.6±1.83
BCL vaccine i.m.	59.09±1.80	3.49±0.1	0.192±0.003	29.86±5.08
BCL vaccine i.m. no challenge	64.04 ±1.5	2.64±0.17	0.188±0.01	23.78±0.48
P.g. Challenge control	62.10±1.88	3.02±0.35	0.23±0.01	34.29±0.33
FimA vaccine i.n.	65.05±0.62	3.02±0.11	0.192±0.007	24.74±2.36
FimA PVXCP vaccine i.n.	65.29±0.75	3.06±0.25	0.213±0.002	26.07±1.94
BCL vaccine i.n.	66.39 ±1.3	3.01±0.1	0.188±0.003	25.29±2.61
BCL vaccine i.n. no challenge	64.15±2.42	2.88±0.4	0.15±0.002	22.94±2.68

เมื่อพิจารณาผลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสต์ด้วยวิธีการอินไดเรคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (Indirect ELISA ในซีรัมสุดท้ายที่เก็บขณะการุณยฆาต) เทียบกับผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเข้าฟัน จากเครื่อง Micro-CT พบว่าสอดคล้องกันโดยผลแอนติบอดีจำเพาะใน

ซีรัมกลุ่มวัคซีน FimA และ FimA-PVXCP มีปริมาณแอนติบอดีจำเพาะมากกว่า วัคซีนทุกชนิดที่กระตุ้นด้วยการหยดทางจมูก เมื่อมีแอนติบอดีจำเพาะต่อฟิมเบรีย ของเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสต์ จึงนำไปสู่ความสามารถป้องกันการละลายตัวของกระดูกในเวลาต่อมาเห็นว่าค่าระยะทางการละลายตัวของกระดูกที่วัดจากรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน กับยอดของกระดูกเข้าฟันในกลุ่ม

วัคซีน FimA-PVXCP ที่ฉีดทางกล้ามเนื้อ มีค่ามัธยฐานของระยะการละลายตัวของกระดูกเพียง 0.176 มิลลิเมตร โดยมีความยาวรากเฉลี่ยจากภาพรังสีคิดเป็น 0.86 มิลลิเมตร กลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ก็มีค่ามัธยฐานของระยะการละลายตัวของกระดูก 0.177 มิลลิเมตรโดยมีความยาวรากเฉลี่ยจากภาพรังสีคิดเป็น 0.9 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม *P.g. challenge control* ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการหยดทางจมูกในกลุ่มวัคซีน FimA และกลุ่ม FimA-PVXCP โดยมีค่ามัธยฐานของระยะการละลายตัวของกระดูกสูงถึง 0.192, 0.213 มิลลิเมตรตามลำดับ และมีความยาวรากเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มจากภาพรังสีคิดเป็น 0.96, 1.00 มิลลิเมตรตามลำดับเช่นกัน สอดคล้องกับผลร้อยละการละลายตัวของกระดูกเมื่อเทียบกับความยาวรากฟัน (Percent bone loss) อีกด้วย

แต่มีในส่วนของการประเมินร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Percent Bone volume/Total volume, BV/TV) ที่กลุ่มวัคซีนที่มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดทางจมูกทั้งกลุ่มวัคซีน FimA กลุ่มวัคซีน FimA-PVXCP กลุ่มวัคซีน BCL มีค่ามัธยฐานของร้อยละปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด มีค่ามากกว่ากลุ่มวัคซีน FimA ที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และหากพิจารณาผลการป้องกันการละลายตัวของกระดูกเข้าฟันกลับพบว่าค่ามัธยฐานร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด (Percent Bone volume/Total volume, BV/TV) ในกลุ่มวัคซีนที่ให้ด้วยเทคนิคหยดทางจมูกกลับมีร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ใกล้เคียงกับกลุ่มวัคซีน ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งขัดแย้งกับผลการวิเคราะห์หาแอนติบอดีในซีรัม แต่ก็พบว่าในทุกวัคซีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิคการหยดวัคซีนทางจมูกมีค่า ร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด ที่สูงกว่าเทคนิคฉีดเข้ากล้ามเนื้อ แต่เห็นว่า สูงกว่า เพียงร้อยละ 0.36 -7.24 เท่านั้น และ หากพิจารณาพารามิเตอร์ที่เป็นระยะทางในการละลายตัวของกระดูกจากรอยต่อเคลือบฟันและเคลือบรากฟันกับยอดของกระดูกเข้าฟันร่วมด้วย ก็พบว่าเทคนิคการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยการหยดวัคซีนทางจมูกนั้นมีค่าร้อยละการละลายตัวของกระดูกที่มากกว่าตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ ทั้งนี้การที่พบว่าร้อยละของปริมาตรกระดูกที่หลงเหลืออยู่ต่อปริมาตรทั้งหมด ของทุกวัคซีนที่กระตุ้นด้วยการหยดวัคซีนมีค่ามากกว่าอาจมาจากการขอบเขตการวัด แม้ว่าการศึกษารั้งนี้ พยายามตีกรอบขอบเขตขนาดการวิเคราะห์โดยมีการกำหนดจากตำแหน่งกายวิภาคที่ชัดเจนแล้ว แต่เราสามารถพบความแตกต่างกันไปในหนูทดลองแต่ละตัว (Variation) เช่น ความยาวรากฟันของหนูแต่ละตัวไม่เท่ากัน และความป่องของตัวฟัน ตลอดจนการกางของรากฟันที่ไม่เท่ากันทำให้จำนวน section ในการที่เริ่ม

วิเคราะห์มีไม่เท่ากัน ทำให้มีปริมาตรของกระดูกต่างกัน (Bone volume) ไม่เท่ากัน ในตัวอย่างที่รากทางก็มีปริมาตรกระดูกที่มากกว่า และอาจเกิดจากการละลายตัวของกระดูกโดยปกติอยู่เพียงด้านบนทางตัวฟัน โดยอาจทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกเป็นระยะทาง แต่ไม่ได้ทำลายปริมาตรกระดูกทั้งก่อนโดยสมบูรณ์ โดยอาจถูกทำลายน้อยจนไม่ส่งผลถึงปริมาตรโดยรวมทำให้พารามิเตอร์ในการพิจารณาการป้องกันการละลายตัวของกระดูกเข้าฟันไม่ชัดเจน สอดคล้องกับเชื้อฟอร์โฟโรโมนเนสที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC® 33277™ ที่ไม่ได้มีความรุนแรงเท่ากับสายพันธุ์อื่น

ในส่วนพารามิเตอร์ความหนาแน่นของกระดูก (BMD) เห็นว่าค่าความหนาแน่นในกลุ่มวัคซีนที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อมีมากกว่ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนด้วยการหยดทางจมูก แต่พบว่าในกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้า กล้ามเนื้อและหยดทางจมูก โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อฟอร์โฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส ที่พบความหนาแน่นเพียง 2.64 และ 2.88 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ ทั้งที่เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับการทำลายจากเชื้อควรมีค่า ความหนาแน่นที่สูงกว่านี้ แต่ทั้งนี้เนื่องจากทั้ง 2 กลุ่มมีจำนวนเพียง 2 ตัว โดยกลุ่มวัคซีน BCL ที่ฉีดเข้า กล้ามเนื้อโดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อฟอร์โฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส มีความหนาแน่นของกระดูก 2.46 และ 2.81 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนกลุ่มวัคซีน BCL ที่หยดทาง จมูก โดยไม่ได้รับการป้ายเชื้อฟอร์โฟโรโมนเนส จึงจิวาลิส มีความหนาแน่นของกระดูก 2.48 และ 3.47 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร สังเกตว่ามีหนูที่มีค่าความหนาแน่นของกระดูกประมาณ 2.4 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร อยู่ในกลุ่ม กลุ่มละ 1 ตัว การเพิ่มจำนวนหนูทดลองอาจทำให้ค่าความหนาแน่นของกระดูกมีแนวโน้มที่ชัดเจนมากขึ้น ส่วนในกลุ่ม *P.g. challenge control* ที่ไม่ได้มีค่าความหนาแน่นของกระดูกที่ชัดเจน เมื่อเทียบกับกลุ่มวัคซีนที่ให้ทางจมูกอาจเนื่องมาจากเชื้อฟอร์โฟโรโมนเนสที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC® 33277™ ที่มีความรุนแรงทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูกน้อย นอกจากนี้ค่าความหนาแน่นของกระดูก (Bone mineralized density ; BMD) นี้คือค่าความหนาแน่นในภาพ Micro CT ที่สร้างขึ้นจากช่วงเฉดสีเทา (Gray scale intensity) ในแต่ละว็อกเซล (Voxel) ค่าที่เราวัดได้จึงเป็นการวัดปริมาณไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) ในตัวอย่าง ออกมาในหน่วย กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งนำมาเทียบกับค่าเฉลี่ยในการสอบเทียบ(Calibrate)กับตัวอย่างที่เราทราบค่าความหนาแน่นของไฮดรอกซีอะพาไทต์ที่ชัดเจน (Phantom) ซึ่งในการทดลองนี้มีข้อจำกัดคือ แท่งแพลนธอม (Phantom rod) ที่มีอยู่ มีเพียง 2 ขนาด คือ ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร และ 16 มิลลิเมตร ในการ ทดลองนี้ใช้ แพลนธอม ขนาดเล็กที่สุดคือเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งจากคู่มือบริษัท Bruker แนะนำให้ใช้ขนาดของแท่ง

แพลนธอม อยู่ที่มีขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 25 และตาราง ที่ 11 (Bruker, 2013)

ตาราง 11 แสดงขนาดแท่งแพลนธอมที่แนะนำในการสอบเทียบค่าความหนาแน่นของกระดูก

ขนาดแท่งแพลนธอม	ชนิดของกระดูกที่เหมาะสม
2 มิลลิเมตร	กระดูกหนูเมาส์ (กระดูกต้นขา, กระดูกแข้ง, กระดูกสันหลัง และอื่นๆ)
4 มิลลิเมตร	กระดูกหนูแรท (กระดูกต้นขา, กระดูกแข้ง, กระดูกสันหลัง และอื่นๆ)
8 มิลลิเมตร	กระดูกกระต่าย, ฟันมนุษย์, กระดูกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, สุนัข
16 มิลลิเมตร	กระดูกที่มีขนาดใหญ่ เช่น กระดูกแกะ
32 มิลลิเมตร	กระดูกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 เซนติเมตรขึ้นไป เช่น กระดูกมนุษย์ กระดูกวัว และอื่นๆ



ภาพ 14 แสดงขนาดแท่งแพลนธอมทั้ง 5 ขนาดของการสอบเทียบค่าความหนาแน่นของกระดูก รูปซ้ายมือ คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร รูปกลาง คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-16 มิลลิเมตร รูปขวามือ คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 32 มิลลิเมตร

ทำให้เห็นว่าในพารามิเตอร์ค่าความหนาแน่นของกระดูกที่วัดได้ อาจมีค่าที่คลาดเคลื่อนได้ ควรใช้พารามิเตอร์ตัวอื่นพิจารณาสรุปถึงการทำลายตัวของกระดูก หรือ รูปร่างของกระดูกที่เปลี่ยนแปลง ประกอบควบคู่กันไป

โดยภาพรวมแล้วการจากผลการทดลองทั้งส่วนของการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันและการป้องกันการละลายตัวของกระดูกวัคซินดีเอ็นเอ ต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้และป้องกันการละลายตัวของกระดูกได้ แต่ยังต้องการการศึกษาในจำนวนประชากร กลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้นให้ข้อมูลเพียงพอ และนำไปสู่การศึกษาขั้นต่อไป หากมีการนำไปศึกษาในมนุษย์ เนื่องจากระบบการทดลองนี้เป็นแนวทางการป้องกัน อาจนำไปใช้เสริมสร้างภูมิคุ้มกันในเด็ก ที่มีโอกาสพบเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ได้น้อย และเลือกกลุ่มที่มีค่าไบโอฟิล์มที่น้อยเช่นกัน เนื่องจากคราบไบโอฟิล์มเป็นปัจจัยเฉพาะที่ ที่คอยรบกวนและเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้โรคปริทันต์อักเสบยังคงอยู่ ดังนั้นแนวทางในการประยุกต์ใช้วัคซินดีเอ็นเอ ต่อเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส อาจเป็นการประยุกต์ใช้เพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย ควบคู่ไปกับการกำจัดคราบไบโอฟิล์ม หินน้ำลาย ที่เป็นปัจจัยเฉพาะที่ โดยจะเป็นประโยชน์ในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันไม่ดี เช่น เบาหวาน ผู้ป่วยที่มีข้อจำกัดทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบ เช่น IL-1 gene polymorphism เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาในอนาคตอาจต้องมีการปรับรูปแบบให้สอดคล้องต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลองในการศึกษาครั้งต่อไปให้มีจำนวนมากขึ้นอาจทำให้สรุปผลความแตกต่างระหว่างวัคซีน FimA และ FimA-PVXCP ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่าวัคซีน FimA-PVXCP สามารถช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อพิมเบรียต่อพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสในสัตว์ทดลองได้

ในการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันการตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (Humoral immune response) หากมีการศึกษาเพิ่มเติมอาจทำการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immune response) ว่ามีปริมาณเซลล์ทางภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องเพิ่มจำนวนขึ้นมากน้อยเพียงใดเนื่องจากดีเอ็นเอวัคซีนสามารถกระตุ้นการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (Cell mediated immune response) ได้อีกทางหนึ่ง จึงสามารถที่จะศึกษาและประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนได้เช่นกัน

ดีเอ็นเอวัคซีนเป็นทางเลือกในการรักษาที่น่าสนใจเนื่องจากมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เฉพาะเจาะจง ความปลอดภัยสูง แต่ในการมาปรับใช้กับโรคปริทันต์อักเสบอาจต้องมีการปรับแต่งเพิ่มประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนให้มากขึ้น อาจต้องศึกษาเลือกพลาสมิดให้เหมาะสม ปรับแต่งความแรง (Potency) ของวัคซีน ทั้งส่วนแสดงออก อาจมีการใช้แอนติเจนมากกว่า 1 ชนิด หรือเลือกวิธี Prime boost vaccination ด้วยวัคซีนดีเอ็นเอเดียวกัน หรือต่างชนิด หรือออกแบบวัคซีนเป็น 2 ชนิดแล้วกระตุ้นร่วมกัน เนื่องจากโรคปริทันต์เกิดจากการส่งเสริมของเชื้อหลายชนิดร่วมกัน (Polymicrobial synergy and dysbiosis model, PSD model) จึงจะเกิดผลที่ดีที่สุด รวมไปถึงการใส่โปรตีนชนิดอื่น ที่สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายให้ตอบสนองต่อวัคซีนได้ดีขึ้น ซึ่งเมื่อมีการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มากพอ จะเป็นพื้นฐานในการต่อยอดนำไปใช้ในการทดลองทางคลินิกในอนาคตอันใกล้

บรรณานุกรม

- กรมอนามัย, ส. (2560). รายงานผลการสำรวจสภาวะช่องปาก ระดับประเทศ ครั้งที่ 8. นนทบุรี.
- ฉัตรชาติ, พ. (2558). ตำราวัคซีนสมาคมโรคติดเชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย (2 ed.). กรุงเทพมหานคร.
- ศุภปิทธิ, ก. (2558). ตำราวัคซีน สมาคมโรคติดเชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย (2 ed.). กรุงเทพมหานคร.
- Abbas, A. k. (2018). *Cellular and molecular immunology* (9th ed.): Philadelphia, Pa. Elsevier.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
- Alam M, M. W. (2012). *The laboratory mouse* (2nd ed.). Amsterdam : Elsevier/Academic Press.
- Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I., & Hamada, S. (1999). Distribution of Porphyromonas gingivalis strains with fimA genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol*, 37(5), 1426-1430. doi: 10.1128/jcm.37.5.1426-1430.1999
- Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N., & Hamada, N. (2004). Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*, 39(2), 136-142. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00719.X
- Bolhassani, A., & Yazdi, S. R. (2009). DNA immunization as an efficient strategy for vaccination. *Avicenna J Med Biotechnol*, 1(2), 71-88.
- Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2012). Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, 333(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.X
- Bowie, A. G., & Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 911-922. doi: 10.1038/nri2436
- Bruker. (2013). HU and BMD calibration in Bruker-MicroCT CT-analyser, pp. 1-30.
- Chattergoon, M., Kim, J., Yang, J. S., Robinson, T., Lee, D., Dentchev, T., Weiner, D. (2000). Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nature biotechnology*, 18, 974-979. doi: 10.1038/79470
- Dickinson, D. P., Kubiniec, M. A., Yoshimura, F., & Genco, R. J. (1988). Molecular cloning

- and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol*, 170(4), 1658-1665. doi: 10.1128/jb.170.4.1658-1665.1988
- Dupuis, M., Denis-Mize, K., Woo, C., Goldbeck, C., Selby, M. J., Chen, M., McDonald, D. M. (2000). Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol*, 165(5), 2850-2858. doi: 10.4049/jimmunol.165.5.2850
- Ebersole, J. L., Bauman, G. R., Cox O'Dell, S. E., & Giardino, A. (1997). Evidence for serum immunoglobulin G (IgG) antibody responses in *Macaca fascicularis* identified by monoclonal antibodies to human IgG subclasses. *Oral Microbiol Immunol*, 12(4), 193-203.
- Enersen, M., Nakano, K., & Amano, A. (2013). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Oral Microbiol*, 5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20265
- Gibson, F. C., 3rd, Gonzalez, D. A., Wong, J., & Genco, C. A. (2004). *Porphyromonas gingivalis*-specific immunoglobulin G prevents *P. gingivalis*-elicited oral bone loss in a murine model. *Infect Immun*, 72(4), 2408-2411. doi: 10.1128/iai.72.4.2408-2411.2004
- Grover, V., Kapoor, A., Malhotra, R., & Kaur, G. (2014). *Porphyromonas gingivalis* antigenic determinants--potential targets for the vaccine development against periodontitis. *Infect Disord Drug Targets*, 14(1), 1-13. doi: 10.2174/1871526514666140827100930
- Guo, H., Wang, X., Jiang, G., & Yang, P. (2006). Construction of a slgA-enhancing anti-*Porphyromonas gingivalis* FimA vaccine and nasal immunization in mice. *Immunol Lett*, 107(1), 71-75. doi: 10.1016/j.imlet.2006.07.008
- Hajishengallis, G. (2009). *Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? *Microbes Infect*, 11(6-7), 637-645. doi: 10.1016/j.micinf.2009.03.009
- Hajishengallis, G. (2011). Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci*, 53(3), 233-240. doi: 10.2330/joralbiosci.53.233
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystone, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35(1), 3-11. doi: 10.1016/j.it.2013.09.001
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic

- inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 30-44. doi: 10.1038/nri3785
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10(10), 717-725. doi: 10.1038/nrmicro2873
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, 27(6), 409-419. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.X
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., Curtis, M. A. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*, 10(5), 497-506. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.006
- Happy, D., Hadge, P., Khopade, S., Sayyed, J., & Sable, S. (2013). Periodontal Vaccines. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 2, 21. doi: 10.4103/2277-4696.159260
- Hirota, J., & Shimizu, S. (2012). *The laboratory mouse* (2 ed.). Amsterdam : Elsevier/Academic Press.
- Houston, L. S., Lukehart, S. A., Persson, G. R., & Page, R. C. (1999). Function of anti-*Porphyromonas gingivalis* immunoglobulin classes in immunized Macaca fascicularis. *Oral Microbiol Immunol*, 14(2), 86-91. doi: 10.1034/j.1399-302X.1999.140202.X
- How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*, 7, 53. doi: 10.3389/fmicb.2016.00053
- Imamura, T., Banbula, A., Pereira, P., Travis, J., & Potempa, J. (2001). Activation of Human Prothrombin by Arginine-specific Cysteine Proteinases (Gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis**. *J Biol Chem*, 276, 18984-18991. doi: 10.1074/jbc.M006760200
- Isogai, H., Isogai, E., Yoshimura, F., Suzuki, T., Kagota, W., & Takano, K. (1988). Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. *Archives of Oral Biology*, 33(7), 479-485. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(88\)90028-3](https://doi.org/10.1016/0003-9969(88)90028-3)
- Jong, R. A., & van der Reijden, W. A. (2010). Feasibility and therapeutic strategies of vaccines against *Porphyromonas gingivalis*. *Expert Rev Vaccines*, 9(2), 193-208. doi: 10.1586/erv.09.156
- Kaliner, M., Marom, Z., Patow, C., & Shelhamer, J. (1984). Human respiratory mucus.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 73(3), 318-323.

doi: [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(84\)90403-2](https://doi.org/10.1016/0091-6749(84)90403-2)

- Kawabata, S., Terao, Y., Fujiwara, T., Nakagawa, I., & Hamada, S. (1999). Targeted salivary gland immunization with plasmid DNA elicits specific salivary immunoglobulin A and G antibodies and serum immunoglobulin G antibodies in mice. *Infect Immun*, 67(11), 5863-5868. doi: 10.1128/iai.67.11.5863-5868.1999
- Kinane, D. F., & Marshall, G. J. (2001). Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J*, 46(1), 2-12. doi: 10.1111/j.1834-7819.2001.tb00267.x
- Klasse, P. J. (2016). How to assess the binding strength of antibodies elicited by vaccination against HIV and other viruses. *Expert Rev Vaccines*, 15(3), 295-311. doi: 10.1586/14760584.2016.1128831
- Kobayashi, T., Takauchi, A., van Sriel, A. B., Vilé, H. A., Hayakawa, M., Shibata, Y., Yoshie, H. (2004). Targeting of *Porphyromonas gingivalis* with a bispecific antibody directed to FcαRI (CD89) improves in vitro clearance by gingival crevicular neutrophils. *Vaccine*, 23(5), 585-594. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.07.015
- Koh, E. M., Kim, J., Lee, J. Y., & Kim, T. G. (2009). Production of Monoclonal Antibodies Specific to FimA of *Porphyromonas gingivalis* and Their Inhibitory Activity on Bacterial Binding. *Immune Netw*, 9(5), 203-207. doi: 10.4110/in.2009.9.5.203
- Kudiyar, N., Dani, N., & Mahale, S. (2011). Periodontal vaccine: A dream or reality. *J Indian Soc Periodontol*, 15(2), 115-120. doi: 10.4103/0972-124X.84378
- Kumar, D., B, D., Dutt, D., & Gupta, D. (2014). Periodontal Vaccine—A Boon In Periodontics. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 13, 54-59. doi: 10.9790/0853-13415459
- Lico, C., Benvenuto, E., & Baschieri, S. (2015). The Two-Faced Potato Virus X: From Plant Pathogen to Smart Nanoparticle. *Front Plant Sci*, 6, 1009. doi: 10.3389/fpls.2015.01009
- Liu, M. A. (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*, 239(1), 62-84. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x
- Lucchese, A., Guida, A., Capone, G., Petruzzi, M., Lauritano, D., & Serpico, R. (2013). Designing a peptide-based vaccine against *Porphyromonas gingivalis*. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, S5, 631-637.
- Marrack, P., Mitchell, T., Bender, J., Hildeman, D., Kedl, R., Teague, K., & Kappler, J. (1998).

- T-cell survival. *Immunol Rev*, 165, 279-285. doi: 10.1111/j.1600-065X.1998.tb01245.x
- Meleshko, A. N., Petrovskaya, N. A., Savelyeva, N., Vashkevich, K. P., Doronina, S. N., & Sachivko, N. V. (2017). Phase I clinical trial of idiotypic DNA vaccine administered as a complex with polyethylenimine to patients with B-cell lymphoma. *Hum Vaccin Immunother*, 13(6), 1-6. doi: 10.1080/21645515.2017.1285477
- Naaz, S., & Kazim, S. (2018). Designing and Reconstruction of pcDNA 3.0 Mammalian Expression Vector with its Multiple Cloning Sites by Directional Cloning Method. *Cloning & Transgenesis*, 07. doi: 10.4172/2168-9849.1000162
- Octavia, M., Soeroso, Y., Kemal, Y., Sunarto, H., & Bachtiar, B. M. (2018). Microbial effects (Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia) after scaling and root planing. *Journal of Physics: Conference Series*, 1073, 062011. doi: 10.1088/1742-6596/1073/6/062011
- Ogawa, T., Ogo, H., Uchida, H., & Hamada, S. (1994). Humoral and cellular immune responses to the fimbriae of Porphyromonas gingivalis and their synthetic peptides. *Journal of Medical Microbiology*, 40(6), 397-402. doi: <https://doi.org/10.1099/00222615-40-6-397>
- Persson, G. R., Engel, D., Whitney, C., Darveau, R., Weinberg, A., Brunsvold, M., & Page, R. C. (1994). Immunization against Porphyromonas gingivalis inhibits progression of experimental periodontitis in nonhuman primates. *Infect Immun*, 62(3), 1026-1031. doi: 10.1128/iai.62.3.1026-1031.1994
- Petersen, P. E., & Ogawa, H. (2012). The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*, 60(1), 15-39. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x
- Petersen, R. L. (2017). Strategies Using Bio-Layer Interferometry Biosensor Technology for Vaccine Research and Development. *Biosensors (Basel)*, 7(4). doi: 10.3390/bios7040049
- Preshaw, P. M., Alba, A. L., Herrera, D., Jepsen, S., Konstantinidis, A., Makrilakis, K., & Taylor, R. (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, 55(1), 21-31. doi: 10.1007/s00125-011-2342-y
- Rimi Najeeb, A. S., Mehvish Saleem. (2020). Periodontal Vaccines: A Dental Regime! Systematic Review. *EC Dental Science*, 19(6), 142-154.
- Robertson, D. (2017). First pass metabolism. *Nurse Prescribing*, 15(6), 303-305. doi:

10.12968/npre.2017.15.6.303

- Savelyeva, N., King, C. A., Vitetta, E. S., & Stevenson, F. K. (2005). Inhibition of a vaccine-induced anti-tumor B cell response by soluble protein antigen in the absence of continuing T cell help. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10987. doi: 10.1073/pnas.0505108102
- Savelyeva, N., Munday, R., Spellerberg, M. B., Lomonossoff, G. P., & Stevenson, F. K. (2001). Plant viral genes in DNA idiotypic vaccines activate linked CD4+ T-cell mediated immunity against B-cell malignancies. *Nature biotechnology*, 19(8), 760-764. doi: 10.1038/90816
- Savelyeva, N., Zhu, D., & Stevenson, F. K. (2003). Engineering DNA vaccines that include plant virus coat proteins. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 20, 101-114. doi: 10.1080/02648725.2003.10648039
- Sharma, A., Honma, K., Evans, R. T., Hruby, D. E., & Genco, R. J. (2001). Oral immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing porphyromonas gingivalis FimA domains. *Infect Immun*, 69(5), 2928-2934. doi: 10.1128/iai.69.5.2928-2934.2001
- Shimizu, S. (2012). *The laboratory mouse* (2 ed.). Amsterdam : Elsevier/Academic Press.
- Shiva Manjunath, R., Sarkar, A., Singla, D., Singh, A., Chatterjee, S., & Chandra, N. (2015). Full Length Review Article. *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 256-261.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2), 134-144. doi: 10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x
- Teng, Y. T. (2006). Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 2--T-cell-mediated immunity in the periodontium. *J Dent Res*, 85(3), 209-219. doi: 10.1177/154405910608500302
- Teshome, A., & Yitayeh, A. (2016). Relationship between periodontal disease and preterm low birth weight: systematic review. *Pan Afr Med J*, 24, 215. doi: 10.11604/pamj.2016.24.215.8727
- Thomas George, V., George, A. K., John, S., & Thomas, A. (2015). Periodontal vaccine: A therapeutic modality on the horizon? *The Saudi Journal for Dental Research*, 6(2), 73-78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjdr.2014.08.002>

- Vajdy, M., & O'Hagan, D. T. (2001). Microparticles for intranasal immunization. *Adv Drug Deliv Rev*, 51(1-3), 127-141. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00167-3
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5(520). doi: 10.3389/fimmu.2014.00520
- Wingrove, J. A., DiScipio, R. G., Chen, Z., Potempa, J., Travis, J., & Hugli, T. E. (1992). Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*. *J Biol Chem*, 267(26), 18902-18907.
- Xu, Y., Yuen, P. W., & Lam, J. K. (2014). Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives. *Pharmaceutics*, 6(3), 378-415. doi: 10.3390/pharmaceutics6030378
- Yang, H. W., Huang, Y. F., & Chou, M. Y. (2004). Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol*, 75(8), 1077-1083. doi: 10.1902/jop.2004.75.8.1077
- Yu, F., Xu, Q.-A., & Chen, W. (2011). A targeted fimA DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice after intra-nasal administration. *J Clin Periodontol*, 38(4), 334-340. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01700.X
- Yun, P. L., Decarlo, A. A., Collyer, C., & Hunter, N. (2001). Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. *Infect Immun*, 69(9), 5650-5660. doi: 10.1128/iai.69.9.5650-5660.2001
- Zaman, M., Chandrudu, S., & Toth, I. (2013). Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug Deliv Transl Res*, 3(1), 100-109. doi: 10.1007/s13346-012-0085-z
- Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2015). *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*, 6(3), 236-243. doi: 10.1080/21505594.2014.999567
- Zhang, W., Ju, J., Rigney, T., & Tribble, G. (2014). *Porphyromonas gingivalis* infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in a periodontitis mouse model. *BMC Oral Health*, 14, 89. doi: 10.1186/1472-6831-14-89